

明 細 書

テロメラーズ活性阻害方法および阻害剤

技術分野

[0001] 本発明は、MAPKAPK3(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)とテロメラーズ逆転写酵素(telomerase reverse transcriptase、TERT)の結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーズ活性化阻害方法、テロメラーズ活性阻害方法、テロメラーズ活性化阻害剤およびテロメラーズ活性阻害剤に関する。

また、MAPKAPK3不活性化型変異体によるテロメラーズ活性阻害方法および該変異体を含んでなるテロメラーズ活性阻害剤に関する。

さらに、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物の同定方法に関する。

また、前記テロメラーズ活性化阻害方法および／または前記テロメラーズ活性阻害方法を用いることを特徴とするテロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。

さらに、前記テロメラーズ活性化阻害方法を用いるテロメラーズ活性化阻害、および／または前記テロメラーズ活性阻害方法を用いるテロメラーズ活性阻害を特徴とするテロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

また、MAPKAPK3、MAPKAPK3をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、TERT、TERTをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットに関する。

背景技術

[0002] テロメラーズは、真核細胞の染色体末端のテロメア配列の伸張反応を触媒する酵素であり、鋳型となるRNA分子であるテロメラーズRNA(TR)と触媒サブユニットであるTERTからなるリボ核蛋白質である(非特許文献1)。

- [0003] テロメラーズは、テロメア長を維持することにより、細胞に不死化能(無限寿命)を与える。テロメアは真核細胞の染色体DNAの末端部分に存在する単純な繰り返し配列であり、染色体の安定性維持に寄与している。細胞分裂においてDNAの複製を司る通常のDNAポリメラーゼではDNAの最末端まで完全に複製が行われないため、細胞分裂に伴いテロメアは短縮される。正常な体細胞では一定回数分裂後に増殖が停止し、細胞の老化あるいは細胞死が生じる。
- [0004] テロメラーズ活性は生殖細胞、各種幹細胞および末梢血リンパ球を除く正常細胞では検出されない。したがって、大多数の正常細胞は分裂毎にテロメア長が短縮するためテロメア長を維持することができず、その寿命は有限である。
- [0005] 一方、癌細胞等不死化した細胞の大多数においては、テロメラーズ活性が検出される。すなわち、細胞分裂に伴い短縮されたテロメアがテロメラーズにより伸張され、その結果、テロメア長が維持されることが、癌細胞の無限増殖性獲得機序の1つであると考えられている。テロメラーズによるテロメア長の維持が癌細胞の不死化に寄与することは、アンチセンスRNAを用いて癌細胞のテロメラーズ活性を消失させると、10数回の細胞分裂の後に細胞増殖が停止し、細胞死が誘導されるという報告により明らかである。また、癌細胞内でドミナントネガティブ型テロメラーズを発現させることにより、テロメラーズ活性の消失と細胞分裂に伴ったテロメア長の短小化、染色体末端融合の出現および細胞死が誘導されることが報告されている。
- [0006] テロメラーズの活性化に関しては、TERT遺伝子の発現活性化による活性化やTE RTのリン酸化を介した活性化等が報告されている。前者については、多くの正常細胞においてTR遺伝子の発現は検出されるもののTERT遺伝子の発現は検出されないのに対し、多くの癌細胞ではTRおよびTERT両遺伝子の発現が認められることから、癌細胞等テロメラーズ活性が検出される細胞では何らかの機構によりTERT遺伝子の発現が活性化されていると考えられている。後者については、癌細胞の核抽出液を脱リン酸化処理すると抽出液中のテロメラーズ活性が低減することが報告されており、テロメラーズの活性化にリン酸化が関与している可能性が示唆されている(非特許文献2)。また、癌細胞由来の核抽出液をAktやプロテインキナーゼC(PKC)と反応させることにより抽出液中のテロメラーズ活性が上昇することが報告されており、こ

れらキナーゼがテロメラーゼ活性化に関与する可能性があると考えられている(非特許文献3および4)。さらに、ヒト臍帯静脈内皮細胞に活性型Aktを過剰に発現させると該細胞内テロメラーゼ活性が上昇することが報告されている(非特許文献5および6)。また、ヒト臍帯静脈内皮細胞にドミナントネガティブ型Aktを過剰に発現させると該細胞内テロメラーゼ活性が低減することが報告されている(非特許文献5および6)。さらに、PI3-キナーゼ阻害剤によるヒト臍帯静脈内皮細胞内テロメラーゼ活性の低減も報告されている(非特許文献5および6)。しかし、Aktについては、乳癌組織におけるAkt活性とその正常組織におけるAkt活性とに差が見られないことが報告されている(非特許文献7)。また、PKCについては、癌細胞内においてPKCがテロメラーゼ活性を上昇させるか否かは不明である。なお、PKCのアイソザイムの1つであるPKC α およびAktとMAPKAPK3とは一次構造上の相同性が低く、それぞれおよそ14.89%、23.76%の相同性を示す。PKCの他のアイソザイムとMAPKAPK3との一次構造上の相同性も同様に低い。

[0007] MAPKAPK3はセリン／スレオニンキナーゼの一つであり、MAPキナーゼファミリー(ERK、p38およびJNK等)によりリン酸化されて活性化することが報告されている。MAPKAPK3の機能については黄体成熟機構への関与が報告されているのみである。また、基質としてHSP27(small heat shock protein 27)、転写因子CREB(cAMP regulatory element binding protein)および転写因子E47をリン酸化することが報告されている。しかし、これら基質とテロメラーゼとの関連についての報告はない。

[0008] 以下に本明細書において引用した文献を列記する。

特許文献1:国際公開第WO01/67299号パンフレット。

非特許文献1:ケラー(Kelleher C.)ら、「トレンズ イン バイオケミカルサイエンス(TRENDS in Biochemical Sciences)」、2002年、第27巻、p. 572-579。

非特許文献2:「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(Journal of Biological Chemistry)」、1997年、第272巻、p. 16729-16732。

非特許文献3:「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー(Journal of Biolog

ical Chemistry)」、1999年、第274巻、p. 13085–13090。

非特許文献4:「ジャーナル オブ バイオロジカル ケミストリー (Journal of Biological Chemistry)」、1998年、第273巻、p. 33436–33442。

非特許文献5:「フェブス レターズ (FEBS Letters)」、2001年、第493巻、p. 21–25。

非特許文献6:「フェブス レターズ (FEBS Letters)」、2003年、第536巻、p. 180–186。

非特許文献7:「インターナショナル ジャーナル オブ キャンサー (International Journal of Cancer)」、2002年、第98巻、p. 148–154。

非特許文献8:「アメリカン ジャーナル オブ レスピレイトリー セル アンド モレキュラー バイオロジー (American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology)」、2002年、第26巻、p. 558–564。

非特許文献9:「キャンサー レターズ (Cancer Letters)」、2003年、第191巻、p. 229–237。

非特許文献10:「ジャーナル オブ クリニカルインベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation)」、1997年、第99巻、p. 1478–1483。

非特許文献11:「キャンサー リサーチ (Cancer Research)」、1995年、第55巻、p. 4182–4187。

非特許文献12:「ジャーナル オブ クリニカルインベスティゲーション (Journal of Clinical Investigation)」、1997年、第99巻、p. 1463–1464。

非特許文献13:「ブラッド (Blood)」、1999年、第93巻、p. 3893–3899。

非特許文献14:「アメリカン ジャーナル オブ パソロジー (American Journal of Pathology)」、1998年、第153巻、p. 1411–1423。

非特許文献15:「ジャーナル オブ ステロイド バイオケミストリー アンド モレキュラー バイオロジー (Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology)」、2002年、第80巻、p. 239–256。

非特許文献16:「パソロジー、リサーチ アンド プラクティス (Pathology, Research and Practice)」、2000年、第196巻、p. 817–826。

非特許文献17:「パソロジー、オンコロジー リサーチ(Pathology Oncology Research)」、2001年、第7巻、p. 171-177。

非特許文献18:「キャンサー リサーチ(Cancer Research)」、1999年、第59巻、p. 279-284。

非特許文献19:「アンチキャンサー リサーチ(Anticancer Research)」、2001年、第21巻、p. 2733-2738。

非特許文献20:「キャンサー リサーチ(Cancer Research)」、2001年、第61巻、p. 6500-6510。

非特許文献21:「ヘパトロジー(Hepatology)」、1998年、第27巻、p. 951-958。

非特許文献22:「ジャーナル オブ ウロロジー(Journal of Urology)」、1999、第162巻、p. 1537-1542。

非特許文献23:ウルマー(K. M. Ulmer)、「サイエンス(Science)」、1983年、第219巻、p. 666-671。

非特許文献24:「ペプチド合成」、丸善株式会社、1975年。

非特許文献25:「ペプチド シンテシス(Peptide Synthesis)」、インターサイエンス(Interscience)、ニューヨーク(New York)、1996年。

非特許文献26:「モレキュラー アンド セルラー バイオロジー(Molecular and Cellular Biology)」、1996年、第16巻、p. 6687-6697。

非特許文献27:キム(Kim N. W.)ら、「サイエンス(Science)」、1994年、第266巻、第5193号、p. 2011-2015。

非特許文献28:ウェン(Wenz C.)ら、「ザ エンボ ジャーナル(The EMBO Journal)」、2001年、第20巻、第13号、p. 3526-3534。

非特許文献29:タテマツ(Tatematsu K.)ら、「オンコジーン(Oncogene)」、1996年、第13巻、第10号、p. 2265-2274。

非特許文献30:ナカムラ(Nakamura Y.)ら、「クリニカル ケミストリー(Clinical Chemistry)」、1999年、第45巻、第10号、p. 1718-1724。

非特許文献31:マエサワ(Maesawa C.)ら、「ヌクレイック アシッズ リサーチ(Nucleic Acids Research)」、2003年、第31巻、第2号、p. E4-4。

非特許文献32:「バイオテクニクス(Biotechniques)」、2002年、第32巻、第5号、p. 1154-1156、1158、1160。

非特許文献33:パディソン(Paddison P. J.)ら、「ジーンズ アンド ディベロプメント(Genes and Development)」、2002年、第16巻、p. 948-958。

発明の開示

発明が解決しようとする課題

- [0009] 本発明の課題は、テロメレーズの活性化に関与する蛋白質を見出して提供することである。また、本発明の課題には、テロメレーズの活性化を阻害する手段およびテロメレーズの活性を阻害する手段を提供することが含まれる。さらに、本発明の課題には、テロメレーズ活性の亢進に起因する疾患、例えば癌疾患の防止および／または治療に有用な手段を提供することが含まれる。

課題を解決するための手段

- [0010] 上記課題を解決すべく本発明者らは鋭意努力し、テロメレーズの触媒サブユニットであるTERTがMAPKAPK3(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)と相互作用することをインシリコ(in silico)で予測した。そして、MAPKAPK3がテロメレーズの活性化に関与することを実証した。具体的には、MAPKAPK3がTERTと結合すること、およびテロメレーズ活性が活性化型MAPKAPK3の用量依存的に上昇することを実証した。これらから、TERTとMAPKAPK3が結合した後、該MAPKAPK3がERK、JNKおよび／またはp38等によりリン酸化されることにより活性化型MAPKAPK3が生成され、該活性化型MAPKAPK3により該TERTがリン酸化され、その結果、テロメレーズ活性が上昇すると考える。
- [0011] 本発明においてはまた、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメレーズ活性を阻害できることを見出した。具体的には、TERTと不活性化型MAPKAPK3が結合すること、およびTERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメレーズ活性が低減し、その結果、ゲノムDNAのテロメア長が短縮されることを実証した。これらから、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、テロメレーズの活性化および／またはテロメレーズを阻害することにより、テロメレーズの活性を阻害すると考える。TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3のキナーゼ活性は、MAP

KAPK3および活性化型MAPKAPK3と比較し、低減または消失している。しかし、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、MAPKAPK3の基質であるTERTへの結合能を有する。したがって、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、MAPKAPK3へのTERTの結合を拮抗的に阻害することによりテロメレーズの活性化を阻害し、その結果、テロメレーズ活性を阻害すると考える。このように、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメレーズ活性を阻害できる。

- [0012] 上述のように、TERTとMAPKAPK3との結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるテロメレーズのリン酸化を阻害することにより、テロメレーズの活性化を阻害することができ、その結果、テロメレーズの活性を阻害できる。
- [0013] また、不活性化型MAPKAPK3を用いてテロメレーズ活性を低減させることができ、その結果、テロメア長の短縮を引き起こすことができた。したがって、TERTとMAPKAPK3との結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるテロメレーズのリン酸化を阻害することにより、テロメレーズ活性を低減させることができ、テロメア長の短縮を引き起こして、癌細胞の有限寿命化と染色体の不安定化による細胞死を誘導できる。その結果、癌疾患、例えば乳癌等を防止および／または治療することができる。
- [0014] 本発明は、これら知見により完成した。
- [0015] すなわち本発明は、以下の群より選ばれるテロメレーズ活性化阻害方法に関する：
- (i) MAPKAPK3とTERTの結合を阻害することを特徴とするテロメレーズ活性化阻害方法、および
 - (ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメレーズ活性化阻害方法。
- [0016] 本発明はまた、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害することを特徴とするテロメレーズ活性化阻害方法に関する。
- [0017] 本発明はさらに、前記いずれかのテロメレーズ活性化阻害方法を用いることを特徴とするテロメレーズ活性阻害方法に関する。
- [0018] 本発明はさらにまた、MAPKAPK3の不活性化型変異体によるテロメレーズ活性阻害方法であって、該変異体がTERTと結合する変異体である、テロメレーズ活性阻

害方法に関する。

- [0019] 本発明はまた、MAPKAPK3の不活性化型変異体が配列表の配列番号6のアミノ酸配列で表される蛋白質である、前記テロメラーゼ活性阻害方法に関する。
- [0020] 本発明はさらに、前記いずれかのテロメラーゼ活性化阻害方法、および／または前記いずれかのテロメラーゼ活性阻害方法を用いることを特徴とするテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。
- [0021] 本発明はさらにまた、テロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患が癌疾患である前記テロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。
- [0022] 本発明はまた、癌疾患が、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌および非小細胞肺癌のいずれかである前記テロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。
- [0023] 本発明はさらに、癌疾患が乳癌疾患である前記テロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法に関する。
- [0024] 本発明はさらにまた、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物とMAPKAPK3および／またはTERTとの相互作用を可能にする条件下、該化合物とMAPKAPK3および／またはTERTとを接触させ、次いで、MAPKAPK3とTERTの結合により生じるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、該シグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、該化合物がMAPKAPK3とTERTの結合を阻害するか否かを決定する方法に関する。
- [0025] 本発明はまた、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物と活性化型MAPKAPK3および／またはTERTとの相互作用を可能にする条件下、該化合物と活性化型MAPKAPK3および／またはTERTとを接触させ、次いで、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化により生じるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、該シグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、該化合

物が活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害するか否かを決定する方法に関する。

[0026] 本発明はさらに、以下の群より選ばれるテロメラー活性化阻害剤に関する：

(i) MAPKAPK3とTERTの結合を阻害することを特徴とするテロメラー活性化阻害剤、および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラー活性化阻害剤。

[0027] 本発明はさらにまた、以下の群より選ばれるテロメラー活性化阻害剤に関する：

(i) MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラー活性化阻害剤、および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラー活性化阻害剤。

[0028] 本発明はまた、以下の群より選ばれるテロメラー活性阻害剤に関する：

(i) MAPKAPK3とTERTの結合を阻害することを特徴とするテロメラー活性阻害剤、および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラー活性阻害剤。

[0029] 本発明はさらに、以下の群より選ばれるテロメラー活性阻害剤に関する：

(i) MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラー活性阻害剤、および

(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラー活性阻害剤。

[0030] 本発明はさらにまた、MAPKAPK3の不活性化型変異体を含んでなるテロメラー活性阻害剤であって、該変異体がTERTと結合する変異体である、テロメラー活性阻害剤に関する。

[0031] 本発明はまた、MAPKAPK3の不活性化型変異体が配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である、前記テロメラー活性阻害剤に関する。

[0032] 本発明はさらに、前記いずれかのテロメラー活性化阻害方法を用いるテロメラー

ス活性化阻害、および／または前記いずれかのテロメラーズ活性化阻害方法を用いるテロメラーズ活性化阻害を特徴とするテロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

[0033] 本発明はさらにまた、前記テロメラーズ活性化阻害剤並びに前記テロメラーズ活性化阻害剤のうち少なくともいずれか1つを含んでなるテロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

[0034] 本発明はまた、テロメラーズ活性の亢進に起因する疾患が、癌疾患である前記いずれかのテロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

[0035] 本発明はさらに、癌疾患が、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌および非小細胞肺癌のいずれかである前記テロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

[0036] 本発明はさらにまた、癌疾患が乳癌疾患である前記テロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤に関する。

[0037] 本発明はまた、MAPKAPK3、MAPKAPK3をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、TERT、TERTをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットに関する。

発明の効果

[0038] 本発明により、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーズ活性化阻害方法、テロメラーズ活性化阻害方法、テロメラーズ活性化阻害剤およびテロメラーズ活性化阻害剤を提供できる。また、MAPKAPK3不活性化型変異体によるテロメラーズ活性化阻害方法および該変異体を含んでなるテロメラーズ活性化阻害剤を提供できる。さらに、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物の同定方法を提供できる。また、前

記テロメラーズ活性化阻害方法および／または前記テロメラーズ活性化阻害方法を用いることを特徴とするテロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法を提供できる。さらに、前記テロメラーズ活性化阻害方法を用いるテロメラーズ活性化阻害、および／または前記テロメラーズ活性化阻害方法を用いるテロメラーズ活性化阻害を特徴とするテロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤を提供できる。また、MAPKAPK3、MAPKAPK3をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、TERT、TERTをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キットを提供できる。

- [0039] 本発明により、テロメラーズの活性化およびテロメラーズ活性を阻害することができる。そのため本発明により、テロメラーズ活性の亢進に起因する疾患の防止および／または治療が可能になる。テロメラーズは、細胞に不死化能(無限寿命)を与える機能を有し、癌細胞等不死化細胞においてその活性が検出されている。本発明によるテロメラーズ活性化阻害およびテロメラーズ活性阻害により、癌細胞の有限寿命化と染色体の不安定化による細胞死が誘導できる。したがって本発明により、例えば、乳癌等の癌疾患の防止および／または治療が可能になる。

図面の簡単な説明

- [0040] [図1]テロメラーズの触媒サブユニットであるTERTとMAPKAPK3の相互作用をインシリコで予測した結果を示す図である。TERTとMAPKAPK3の間でローカルアライメントを行い、高いスコア(score)を示した領域を図示した。アミノ酸配列は1文字表記した。図中の数字は、TERTまたはMAPKAPK3の各アミノ酸配列における、図示した各領域のN末端アミノ酸の位置を意味する。(実施例1)
- [図2]MAPKAPK3または活性化型MAPKAPK3と³⁵S-メチオニン標識蛋白質として合成したTERTとが結合することを、グルタチオンセファロースを用いたプルダウン法により検出した結果を示す図である。また、不活性化型MAPKAPK3も、MAPKAPK3または活性化型MAPKAPK3と比較して弱い結合であるが、TERTと結合した。GSTはTERTと結合しなかった。矢頭は、TERTの位置を示す。(実施例2)

[図3] TERTとHA-MAPKAPK3を共発現させた細胞の細胞溶解液(レーン2)について、抗HA抗体で免疫沈降(IP)後に抗TERT抗体を用いたウエスタンブロッティング(WB)で蛋白質の検出を行なったところ、HA-MAPKAPK3の共沈降が認められた(最下段のパネル)ことを示す図である。レーン1は、HA-MAPKAPK3をコードするポリヌクレオチドを含むベクターの代わりに空ベクターをトランスフェクションした細胞の細胞溶解液についての結果を示す。(実施例3)

[図4] 活性化型MAPKAPK3を一過性発現させた細胞では、細胞内テロメラーゼ活性が上昇したことを示す図である。一方、不活性化型MAPKAPK3を一過性発現させた細胞では、細胞内テロメラーゼ活性は低減した。用いた細胞は、テロメラーゼ活性を有する細胞である。図中、「**」はスチューデント t-テストで有意差($p < 0.01$)が認められたことを示す。(実施例4)

[図5] 脱リン酸化処理により、脱リン酸化酵素の用量依存的にテロメラーゼ活性が低減したことを示す図である。(実施例5)

[図6] 脱リン酸化処理によりテロメラーゼ活性が低減した核抽出液に活性化型MAPKAPK3を添加してリン酸化反応を行なったところ、活性化型MAPKAPK3用量依存的にテロメラーゼ活性が上昇したことを示す図である。GSTを添加して同様にリン酸化反応を行なったときは、テロメラーゼ活性の上昇は認められなかった。図中、「CIP」とは、脱リン酸化酵素を意味する。(実施例5)

[図7] 脱リン酸化処理によりテロメラーゼ活性が低減した核抽出液に活性化型MAPKAPK3を添加してリン酸化反応を行なったところテロメラーゼ活性が上昇したが、MAPKAPK3または不活性化型MAPKAPK3によってはテロメラーゼ活性の上昇が認められなかったことを示す図である。(実施例5)

[図8-A] 不活性化型MAPKAPK3発現レトロウイルス感染細胞(inactive 3pK、図中では黒カラムで示す)において、親株(parent、図中では白カラムで示す)または空ウイルス感染細胞(empty、図中では斜線カラムで示す)と比較して、テロメラーゼ活性が顕著に低減したことを示す図である。(実施例6)

[図8-B] 不活性化型MAPKAPK3発現レトロウイルスを癌細胞株(PC-3およびU-87MG)に感染させたときに、感染細胞(inactive 3pK)において不活性化型M

APKAPK3が過剰発現されたことを示す図である。コントロールである β -チューブリンの発現量は、感染細胞(inactive 3pK)、親株(parent)および空ウイルス感染細胞(empty)のいずれにおいても同程度であった。不活性化型MAPKAPK3(N末端HA-tag付加)の検出は抗HA抗体、 β -チューブリンの検出は抗 β -チューブリン抗体を用いたウェスタンブロット(WB)により実施した。(実施例6)

[図9]不活性化型MAPKAPK3発現レトロウイルスを癌細胞株U-87MGに感染させたときに、感染細胞(inactive 3pK)において経時的なテロメア長の短縮が認められたことを示す図である。一方、親株(parent)および空ウイルス感染細胞(empty)においてはテロメア長の変化は認められなかった。(実施例6)

発明を実施するための最良の形態

[0041] 以下、本発明について発明の実施の態様をさらに詳しく説明する。

本明細書においては単離された若しくは合成の完全長蛋白質;単離された若しくは合成の完全長ポリペプチド;または単離された若しくは合成の完全長オリゴペプチドを意味する総称的用語として「蛋白質」という用語を使用することがある。ここで蛋白質、ポリペプチド若しくはオリゴペプチドはペプチド結合または修飾されたペプチド結合により互いに結合している2個以上のアミノ酸を含むものである。以降、アミノ酸を表記する場合、1文字または3文字にて表記することがある。

[0042] 本発明においては、テロメレーズの触媒サブユニットであるTERTがMAPKAPK3と相互作用することを、特許文献1に記載の方法に従ってインシリコで予測した。そして、TERTがMAPKAPK3と結合することを実証した。さらに、テロメレーズ活性が活性化型MAPKAPK3の用量依存的に上昇することを明らかにした。また、TERTと不活性化型MAPKAPK3が結合すること、およびTERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメレーズ活性が低減し、その結果、ゲノムDNAのテロメア長が短縮されることを実証した。

[0043] MAPKAPK3はセリン/スレオニンキナーゼの一つであり、MAPキナーゼファミリー(ERK、p38およびJNK等)によりリン酸化されて活性化することが報告されている。MAPKAPK3の機能については黄体成熟機構への関与が報告されているのみである。また、基質としてHSP27、転写因子CREBおよび転写因子E47をリン酸化す

ることが報告されている。しかし、これら基質とテロメラーゼとの関連についての報告はない。

- [0044] MAPKAPK3を活性化することが知られているp38は乳癌組織および非小細胞肺癌組織において活性化しているという報告がある(非特許文献7-9)。また、MAPKAPK3を活性化することが知られているERKは、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌等の癌組織において活性化しているという報告がある(非特許文献10-22)。したがって、これらの癌組織においてMAPKAPK3の活性化によりテロメラーゼが活性化するというシグナルが存在している可能性があると考ええる。
- [0045] 本発明において、MAPKAPK3がTERTと結合すること、および活性化型MAPKAPK3によりテロメラーゼ活性が上昇することを明らかにした。これらから、TERTとMAPKAPK3が結合した後、該MAPKAPK3がp38等によりリン酸化されることにより活性化型MAPKAPK3が生成され、該活性化型MAPKAPK3により該TERTがリン酸化され、その結果、テロメラーゼ活性が上昇すると考える。
- [0046] したがって、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することにより、テロメラーゼの活性化を阻害でき、その結果、テロメラーゼ活性を阻害できると考える。
- [0047] さらに本発明において、TERTと不活性化型MAPKAPK3が結合すること、およびTERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメラーゼ活性が低減し、その結果、テロメア長が短縮されることを明らかにした。TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、テロメラーゼの活性化および／またはテロメラーゼを阻害することにより、テロメラーゼの活性を阻害すると考える。TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3のキナーゼ活性は、MAPKAPK3および活性化型MAPKAPK3と比較し、低減または消失している。しかし、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、MAPKAPK3の基質であるTERTへの結合能を有する。したがって、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3は、MAPKAPK3へのTERTの結合を拮抗的に阻害することによりテロメラーゼの活性化を阻害し、その結果、テロメラーゼ活性を阻害する可能性が高い。TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメラーゼ

活性を阻害できる。

- [0048] テロメアは真核細胞の染色体DNAの末端部分に存在する単純な繰り返し配列であり、染色体の安定性維持に寄与している。したがって、テロメア長が短縮されることにより、癌細胞の有限寿命化と染色体の不安定化による細胞死が誘導される。
- [0049] TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3を発現させた癌細胞において実際に、テロメラーゼ活性が低減し、テロメア長の短縮が引き起こされたことから、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3によりテロメラーゼ活性を低減させることによって細胞死を誘導できると考える。
- [0050] テロメラーゼが癌の種類を問わずほとんどの癌細胞で発現していることから、TERTと結合する不活性化型MAPKAPK3を用いること、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することにより、テロメラーゼ活性を阻害し、それにより癌細胞の細胞死を誘導して、癌疾患等、例えば乳癌疾患等を防止および／または治療できる。
- [0051] 本発明の一態様は、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害すること、または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーゼ活性化阻害方法および該テロメラーゼ活性化阻害方法を用いるテロメラーゼ活性化阻害方法に関する。さらに、本発明の一態様は、MAPKAPK3の不活性化型変異体によるテロメラーゼ活性化阻害方法であって、該変異体がTERTと結合する変異体である、テロメラーゼ活性化阻害方法に関する。好ましくは、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌並びに非小細胞肺癌等のヒト癌組織におけるテロメラーゼ活性化阻害方法およびテロメラーゼ活性化阻害方法、さらに好ましくは、ヒト乳癌組織におけるテロメラーゼ活性化阻害方法およびテロメラーゼ活性化阻害方法に関する。
- [0052] 「活性化型MAPKAPK3」とは、キナーゼ活性を示すように活性化されたMAPKAPK3を意味する。活性化型MAPKAPK3は、MAPKAPK3がMAPキナーゼファミリー (ERK、p38およびJNK等) 等によりリン酸化されて活性化したMAPKAPK3であることができる。好ましくは、MAPキナーゼファミリー等により、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンがリン酸化された結果、リン酸化を受

ける前のMAPKAPK3と比較し、高いキナーゼ活性を示すように活性化されたMAPKAPK3であることができる。また、MAPKAPK3にキナーゼ活性を示すような変異が天然においてあるいは遺伝子工学的手法を用いて導入されたMAPKAPK3変異体であってもよい。かかるMAPKAPK3変異体として、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンをグルタミン酸に置換した変異体(配列番号8)が例示できる。

- [0053] 「MAPKAPK3」とは、配列表の配列番号1に記載の塩基配列で表されるポリヌクレオチドがコードするアミノ酸配列(配列番号2)からなる蛋白質であり、リン酸化等により活性化されておらず、キナーゼ活性を示さないあるいはキナーゼ活性が低いものを意味する。
- [0054] TERT遺伝子および該遺伝子がコードする蛋白質は、それぞれ配列表の配列番号3および配列番号4に記載の各配列で表される遺伝子および蛋白質である。
- [0055] 「MAPKAPK3とTERTの結合」とは、MAPKAPK3とTERTが複合体を形成するように、水素結合、疎水結合または静電的相互作用等の非共有結合により、MAPKAPK3とTERTが相互作用することを意味する。ここでの結合とは、MAPKAPK3とTERTがそれら分子の一部分において結合すれば足りる。例えば、MAPKAPK3またはTERTを構成するアミノ酸の中に、MAPKAPK3とTERTの結合に関与しないアミノ酸が含まれていてもよい。
- [0056] MAPKAPK3とTERTの結合は、免疫沈降法による共沈物の確認、ツーハイブリッド法、ウエスタンブロット法および蛍光共鳴エネルギー転移法等の自体公知の方法またはこれらの方法を組み合わせることにより検出され得る。
- [0057] 例えば、まず、N末端にグルタチオンS トランスフェラーゼ(GST)を融合させたMAPKAPK3(GST-MAPKAPK3)と³⁵S-メチオニン標識蛋白質として合成したTERTとを反応させる。次いで、グルタチオンセファロースによりGST-MAPKAPK3を回収し、ドデシル硫酸ナトリウムポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)により展開する。オートラジオグラフィーでTERTを検出することにより、MAPKAPK3とTERTの結合を検出できる(実施例2を参照)。
- [0058] また、N末端にHA-tagが付加されたMAPKAPK3とTERTとを反応させた後に

、抗HA抗体を用いて該MAPKAPK3を免疫沈降する。次いで、共沈物を抗TERT抗体を用いてウェスタンブロッティングすることにより、MAPKAPK3とTERTの結合を検出できる(実施例3を参照)。

- [0059] 「テロメレーズの活性化」とは、テロメレーズを構成するTERTが活性化型MAPKAPK3によりリン酸化を受けた結果、リン酸化を受ける前と比較しテロメレーズ活性が上昇することを意味する。
- [0060] MAPKAPK3、TERTおよびこれらの遺伝子は上記各配列で表されるものに限らず、一般に知られているMAPKAPK3およびTERTの機能を有する限りにおいて、上記各配列において1乃至数個の変異を有する蛋白質およびポリヌクレオチドであることができる。また、これらの機能を促進するあるいは欠失させるといった所望の目的のために、上記各配列に1乃至数個の変異を導入した変異体を用いることもできる。
- [0061] MAPKAPK3遺伝子およびTERT遺伝子は、例えば、それぞれの遺伝子の発現が認められる適当な起源(例えば、ヒト乳癌由来の細胞)から、自体公知のクローニング方法等を用いて容易に取得され得る。活性化型MAPKAPK3遺伝子は、例えば、MAPKAPK3遺伝子の変異体として、MAPKAPK3遺伝子に部位特異的突然変異法等自体公知の変異導入手段を用いて変異を導入することにより取得され得る。これら遺伝子がコードする蛋白質は、例えば、それぞれの遺伝子を用いた自体公知の遺伝子工学的手法により取得され得る。
- [0062] MAPKAPK3とTERTの結合阻害は、例えば、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物を用いることにより実施できる。ここでは、このような阻害効果を有する化合物(後述する例として競合阻害効果を有するポリペプチド類、抗体および低分子化合物等が挙げられる)を阻害剤と称する。
- [0063] MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物として、好ましくは当該結合を特異的に阻害する化合物、より好ましくは当該結合を特異的に阻害する低分子量化合物が挙げられる。MAPKAPK3とTERTの結合を特異的に阻害するとは、当該結合を強く阻害するが、他の蛋白質間結合は阻害しないか、弱く阻害することを意味する。
- [0064] MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物としてその他に、MAPKAPK3と

TERTが結合する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドが例示できる。かかるポリペプチドは、蛋白質間の結合を競合的に阻害し得る。かかるポリペプチドは、MAPKAPK3またはTERTのアミノ酸配列から設計し、自体公知のペプチド合成法により合成したものから、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害するものを選択することにより取得できる。このように特定されたポリペプチドに、1乃至数個のアミノ酸の欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入したものも本発明の範囲に包含される。このような変異を導入したポリペプチドは、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害するものが好ましい。変異を有するポリペプチドは天然に存在するものであってよく、また変異を導入したものであってもよい。欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマーの技術(非特許文献23)を利用できる。このような変異の導入において、当該ポリペプチドの基本的な性質(物性、機能または免疫学的活性等)を変化させないという観点から、例えば、同族アミノ酸(極性アミノ酸、非極性アミノ酸、疎水性アミノ酸、親水性アミノ酸、陽性荷電アミノ酸、陰性荷電アミノ酸および芳香族アミノ酸等)の間での相互の置換は容易に想定される。さらに、これら利用できるポリペプチドは、その構成アミノ基またはカルボキシル基等を、例えばアミド化修飾する等、機能の著しい変更を伴わない程度に改変できる。

[0065] 上記ポリペプチドは、ペプチド化学において知られる一般的な方法で製造できる。具体的には、成書(非特許文献24および25)に記載の方法が例示されるが、これらに限らず公知の方法が広く利用できる。具体的には、通常の液相法および固相法によるペプチド合成法、例えばFmoc法等が挙げられる。または市販のアミノ酸合成装置を用いて製造できる。あるいは遺伝子工学的手法により取得することもできる。例えば目的とするポリペプチドをコードする遺伝子を宿主細胞中で発現できる組換え発現ベクターを作成し、これを適当な宿主細胞、例えば大腸菌にトランスフェクションして形質転換した後に該形質転換体を培養し、次いで得られる培養物から目的とするポリペプチドを回収することにより製造できる。

[0066] MAPKAPK3とTERTの結合の阻害は、MAPKAPK3またはTERTを認識する抗体であって、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する抗体を用いることによっても実施できる。かかる抗体は、MAPKAPK3またはTERT自体、またはこれら蛋白質

の断片、好ましくはMAPKAPK3とTERTが結合する部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドを抗原として自体公知の抗体作製法により取得できる。

- [0067] 「活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化」とは、活性化型MAPKAPK3により、TERTを構成するアミノ酸のうちセリン、スレオニン残基のヒドロキシル基にアデノシン三リン酸(ATP)の γ -リン酸基が転移されることを意味する。一般的に酵素活性を有する蛋白質は、リン酸化によりその酵素活性が調節されることが多い。したがって、リン酸化によりTERTの逆転写酵素活性が促進され、その結果テロメラーゼ活性が上昇すると考える。
- [0068] 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化、およびリン酸化されたTERTの検出は、自体公知の方法により実施できる。生体内においては、TERTとMAPKAPK3が結合した後に、該MAPKAPK3がERK、JNKおよびp38等のMAPキナーゼファミリー等により活性化されると考える。しかし、実施例に示したように、変異体である活性化型MAPKAPK3はTERTと結合し、かつ活性化型MAPKAPK3の用量依存的にテロメラーゼ活性を上昇させる。したがって、活性化型MAPKAPK3とTERTとを共存させることにより、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を実施できる。活性化型MAPKAPK3として、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンをグルタミン酸に置換したMAPKAPK3変異体が好ましく例示できる。
- [0069] 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化、およびリン酸化されたTERTを検出する方法として、具体的には、次の方法が例示できる。
- [0070] 放射性同位体で標識されたATP(例えば $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$)を含むキナーゼバッファー中で活性化型MAPKAPK3とTERTとを接触させ、反応後にSDS-PAGEで反応産物を展開し、オートラジオグラフィーにより放射活性を測定することにより、活性化型MAPKAPK3によりリン酸化されたTERTを検出できる。
- [0071] また、TERT自体を自体公知の方法によりマイクロタイタープレートのウェル上に固定した後、該ウェル内にATPおよび活性化型MAPKAPK3を添加し、TERTと活性化型MAPKAPK3を接触させ、反応後に、予めユーロピウム(Eu)標識されかつリン酸化されたTERTを認識する抗体を用いて、リン酸化されたTERTと該抗体との抗

原抗体反応を行い、時間分解蛍光を検出することにより、活性化型MAPKAPK3によりリン酸化されたTERTを検出できる。

- [0072] TERTを結合させたドナービーズと活性化型MAPKAPK3とを接触させ、反応後に抗リン酸化TERT抗体を結合させたアクセプタービーズを反応溶液に添加し、両ビーズが近接したときのみ発生するシグナル(例えば、ドナービーズをレーザー照射した際に発生する一重項状態の酸素が、アクセプタービーズに含まれる蛍光物質を活性化させた結果、発生する一定波長の光)を検出することにより、活性化型MAPKAPK3によりリン酸化されたTERTを検出できる。
- [0073] また、自体公知のシンチレーションプロキシミティアッセイ法(Scintillation proximity assay, SPA)を用いて、活性化型MAPKAPK3によりリン酸化されたTERTを検出できる。
- [0074] 上記例示した方法は、TERTの代わりに、活性化型MAPKAPK3によりリン酸化を受けるTERTの部分ポリペプチドを基質として用いて実施することもできる。MAPKAPK3の基質であるHSP27およびeEF2キナーゼがMAPKAPK3によりリン酸化を受ける部位についての報告から、活性化型MAPKAPK3によりリン酸化を受けるTERTの部位はRXXSの4つのアミノ酸(ここで、Xはいずれのアミノ酸でもあり得る)からなる部分ポリペプチドに相当する部位と予測される。かかる部位を含むTERTの部分ポリペプチドのうち、活性化型MAPKAPK3によるリン酸化を受けることが実証されたTERTの部分ポリペプチドをTERTの代わりに基質として用いることができる。TERTの部分ポリペプチドは自体公知の方法により合成できる。
- [0075] 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化の阻害は、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物を用いることにより実施できる。活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物として、例えば、活性化型MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物が挙げられる。活性化型MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物は、活性化型MAPKAPK3とTERTの相互作用を阻害できるため、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害すると考える。また、TERTがMAPKAPK3と結合し、その後、該MAPKAPK3がERK、JNKおよび／またはp38等によりリン酸化されることにより活性化型MAPKAPK3

が生成され、該活性化型MAPKAPK3により該TERTがリン酸化されると考えられることから、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物は、MAPKAPK3とTERTの相互作用を阻害し、その結果、活性化型MAPKAPK3の生成とそれに引き続いて起きる活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害すると考える。したがって、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物が、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物として好ましく例示できる。その他、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物として、活性化型MAPKAPK3のキナーゼ活性を阻害する化合物が挙げられる。

[0076] あるいは、細胞内、例えば癌細胞内のMAPKAPK3の発現をRNA干渉の手法により低減させることにより、活性化型MAPKAPK3の生成を低減させ、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害できる。その結果、テロメラーゼ活性を低減または消失させることができる。したがって、かかるRNA干渉の手法によりテロメラーゼ活性を低減または消失させるsiRNA (small interfering RNA)もテロメラーゼ活性を阻害する化合物として例示できる。癌細胞にsiRNAを導入することにより、該細胞内の該細胞内のテロメラーゼ活性は低減し、それにより細胞分裂に伴う染色体末端のテロメア長の短縮化が起こり、細胞死を誘導することができる。

[0077] 「MAPKAPK3の不活性化型変異体」とは、MAPKAPK3に、アミノ酸の欠失、置換、付加または挿入等の変異を導入したMAPKAPK3であって、MAPKAPK3および活性化型MAPKAPK3と比較しキナーゼ活性が減弱し、または消失したMAPKAPK3を意味する。MAPKAPK3の不活性化型変異体は、天然に存在するものであることができ、人工的に変異を導入したものであることもできる。かかる変異を導入する手段は自体公知であり、例えばウルマーの技術(非特許文献23)を利用して実施できる。好ましくは、例えば、MAPKAPK3の、ERK、JNKおよび／またはp38等のMAPKAPK3をリン酸化および活性化するキナーゼによりリン酸化される部位、MAPKAPK3のTERTとの結合部位およびMAPKAPK3のATPとの結合部位のうち少なくともいずれか1つの部位に変異を導入したMAPKAPK3であることができる。MAPKAPK3をリン酸化および活性化するキナーゼによりリン酸化されるMAPKAPK3の部位として、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目および第313番目

、MAPKAPK3とATPとの結合部位として該アミノ酸配列第73番目が報告されている(非特許文献26)。したがって、MAPKAPK3の不活性化型変異体として、MAPKAPK3のアミノ酸配列の第73番目、第201番目および第313番目のうちの少なくともいずれか1つの部位のアミノ酸に変異を導入したMAPKAPK3の不活性化型変異体が挙げられる。

[0078] より好ましくは、MAPKAPK3の不活性化型変異体であって、かつTERTと結合する不活性化型変異体が適当である。かかる変異体として、配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質を例示できる。該変異体は、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目および第313番目のスレオニンがアラニンに置換されたMAPKAPK3の不活性化型変異体である。該変異体は、TERTと結合し(実施例2および図2を参照)、またテロメラーゼ活性を有する細胞で発現させたときに、細胞内テロメラーゼ活性を低減させた(実施例4および図4を参照)。また、該変異体は、癌細胞で発現させたときに、細胞内テロメラーゼ活性を低減させ、その結果、テロメア長の短縮を引き起こした(実施例6、図8-A、図8-Bおよび図9を参照)。これらから、細胞内において、該変異体は、テロメラーゼの活性化および／またはテロメラーゼを阻害することにより、テロメラーゼの活性を阻害すると考える。

[0079] さらに好ましくは、TERTと結合するMAPKAPK3の不活性化型変異体であって、MAPKAPK3とTERTの結合を拮抗的に阻害するMAPKAPK3の不活性化型変異体が適当である。かかる不活性化型変異体は、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害することによりテロメラーゼの活性化を阻害し、結果としてテロメラーゼ活性を阻害できる。配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質は、TERTと結合し、テロメラーゼ活性を有する細胞や癌細胞で発現させたときに、細胞内テロメラーゼ活性を低減させた。すなわち、該蛋白質は、MAPKAPK3に対してドミナントネガティブ効果を有すると考える。したがって、該蛋白質は、MAPKAPK3とTERTの結合を拮抗的に阻害するMAPKAPK3の不活性化型変異体であると発明者らは考えている。

[0080] MAPKAPK3の不活性化型変異体とTERTの結合は、前記MAPKAPK3とTERTの結合の検出方法と同様の方法により検出され得る。

- [0081] 本発明の別の一態様は、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物の同定方法に関する。本化合物の同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して実施できる。例えば、上述のようなMAPKAPK3とTERTの結合を検出する方法を用いて実施できる。
- [0082] MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物の同定方法は、具体的には、調べようとする化合物(被検化合物)とMAPKAPK3および／またはTERTとの相互作用を可能にする条件を選択し、当該条件下で、被検化合物とMAPKAPK3および／またはTERTとを接触させ、MAPKAPK3とTERTの結合を検出し得るシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより実施できる。例えばMAPKAPK3とTERTの結合により生じるシグナルまたは該結合のマーカーが、被検化合物をMAPKAPK3またはTERTと接触させたときに消失あるいは低減する等の変化を示した場合、当該被検化合物はMAPKAPK3とTERTの結合を阻害すると判定できる。かかる同定方法において、被検化合物をMAPKAPK3および／またはTERTと予め接触させ、その後にMAPKAPK3とTERTの結合反応を行なうことができ、または被検化合物をこれらの結合反応に共存させることもできる。被検化合物とMAPKAPK3および／またはTERTとの相互作用を可能にする条件は、インビトロのものであってもよく、インビボのものであってもよい。例えば、MAPKAPK3とTERTとを共発現させた細胞を用いることができる。かかる細胞は、MAPKAPK3をコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとTERTをコードするポリヌクレオチドを含む適当なベクターとを用いて慣用の遺伝子工学的方法でこれらを細胞にトランスフェクションすることにより取得できる。あるいはかかる細胞は、テロメラーゼ活性が認められた細胞にMAPKAPK3をコードするポリヌクレオチドをトランスフェクションすることによっても取得できる。さらに、実施例2に示したように、活性化型MAPKAPK3がTERTと結合したことから、MAPKAPK3の代わりに、活性化型MAPKAPK3を用いて同様の同定方法を構築することができる。この場合、ERK、JNKおよび／またはp38をコードするポリヌクレオチドを共発現させて、細胞内でMAPKAPK3をリン酸化して活性化させることもできる。ここでシグナルとは、そのもの自体がその物理的また

は化学的性質により直接検出され得るものを指し、マーカーとはそのものの物理的または生物学的性質を指標として間接的に検出され得るものを指す。シグナルとして、ルシフェラーゼ、および放射性同位体等、マーカーとして、レポーター遺伝子、例えばクロラムフェニコールアセチルトランスフェラーゼ遺伝子等、または検出用のエピトープタグ、例えば6×His-tag等、公知のものが利用できる。これらシグナルまたはマーカーの検出方法は当業者には周知である。MAPKAPK3とTERTの結合は、簡便には、これら蛋白質の結合の存在若しくは不存在の検出および／またはその量の変化の測定により判定できる。これら蛋白質の結合の検出は、自体公知の蛋白質またはペプチドの検出方法、例えばウェスタンブロッティング法等を用いて実施できる。

[0083] MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物の同定方法は、具体的には例えば、MAPKAPK3またはTERTの一方を固相化し、他方をシグナルで標識化して用いて結合反応を行い、標識シグナルを定量的に測定するといった当業者に知られた一般的なインビトロ(in vitro)における結合試験系を用いて実施できる。このような試験系に被検化合物を共存させたときの標識シグナルが、被検化合物の非共存下における標識シグナルと比較して低減するまたは消失する場合、該被検化合物はMAPKAPK3とTERTの結合を阻害すると判定できる。

[0084] MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物の同定方法はまた、GST融合MAPKAPK3またはGST融合活性化型MAPKAPK3とTERTとをインビトロで反応させて、GSTを用いたプルダウン法により両蛋白質の結合を検出する試験系(実施例2を参照)を用いて実施できる。このような試験系におけるMAPKAPK3とTERTとの結合の検出は、TERTを予め標識物質で標識しておき、その標識物質を検出することにより実施できる。標識物質は、一般に蛋白質の検出に使用されている標識物質であればいずれも使用できる。具体的には、³⁵S等の放射性同位体等が好ましく例示できる。このような試験系に被検化合物を共存させたときに検出される標識物質の量が、被検化合物の非共存下において検出される標識物質の量と比較して低減するまたは消失する場合、該被検化合物はMAPKAPK3とTERTの結合を阻害すると判定できる。

- [0085] あるいは、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物の同定方法は、動物細胞にTERTをコードするポリヌクレオチドおよびMAPKAPK3をコードするポリヌクレオチドをトランスフェクションして得られた細胞を用いて細胞内における結合反応を検出する試験系(実施例3を参照)を用いて実施できる。このような試験系におけるMAPKAPK3とTERTとの結合の検出は、免疫沈降法やウェスタンブロットティング等の公知方法で実施できる。このような試験系に被検化合物を共存させたとき、被検化合物の非共存下における結果と比較して、結合する蛋白質量が減少するあるいは結合が検出されなくなる場合、該被検化合物はMAPKAPK3とTERTの結合を阻害すると判定できる。
- [0086] また、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物の同定方法の実施に、公知のツーハイブリッド(two-hybrid)法を利用することもできる。例えば、MAPKAPK3とDNA結合蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、TERTと転写活性化蛋白質を融合蛋白質として発現するプラスミド、および適切なプロモーター遺伝子に接続したlacZ等レポーター遺伝子を含むプラスミドを酵母、真核細胞等に導入し、被検化合物を共存させた場合のレポーター遺伝子の発現量を被検化合物非存在下でのレポーター遺伝子の発現量とを比較することにより達成できる。被検化合物を共存させた場合のレポーター遺伝子の発現量が被検化合物非存在下でのレポーター遺伝子の発現量と比較して減少した場合、該被検化合物はMAPKAPK3とTERTとの結合を阻害する作用を有すると判定できる。
- [0087] ビアコアシステム(BIACORE system)等の表面プラズモン共鳴センサー、SPA法、あるいは蛍光共鳴エネルギー転移(Fluorescence resonance energy transfer, FRET)を応用した方法を用いて、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物の同定方法を実施することもできる。
- [0088] 本発明の別の一態様は、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物の同定方法に関する。本化合物の同定方法は、自体公知の医薬品スクリーニングシステムを利用して実施できる。例えば、上述のような活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を検出する方法を用いて実施できる。
- [0089] 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物の同定方法は、

具体的には、被検化合物と活性化型MAPKAPK3および／またはTERTとの相互作用を可能にする条件を選択し、当該条件下で、被検化合物と活性化型MAPKAPK3および／またはTERTとを接触させ、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を検出し得るシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、このシグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより実施できる。例えば活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化により生じるシグナルまたは該結合のマーカーが、被検化合物を活性化型MAPKAPK3および／またはTERTと接触させたときに消失あるいは低減する等の変化を示した場合、当該被検化合物は活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害すると判定できる。被検化合物と活性化型MAPKAPK3および／またはTERTとの相互作用を可能にする条件は、インビトロのものであってよく、インビボのものであってもよい。例えば、活性化型MAPKAPK3とTERTとを共発現させた細胞を用いることができる。

[0090] 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物の同定方法は、具体的には例えば、テロメラーゼ活性が確認されている細胞から調製した核抽出液を用い、脱リン酸化処理を行なった後、活性化型MAPKAPK3を添加してテロメラーゼ活性の上昇を測定する試験系(実施例5を参照)を用いて実施できる。かかる試験系に被検化合物を共存させたときにテロメラーゼ活性の上昇が阻害された場合、該被検化合物はTERTのリン酸化を阻害する化合物であると判定できる。または、かかる試験系において、テロメラーゼ活性の上昇を測定する代わりに、TERTのリン酸化を検出することにより、TERTのリン酸化を阻害する化合物の同定を実施できる。

[0091] 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物の同定方法はまた、上述した活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化、およびリン酸化されたTERTの検出を実施する方法を用いた試験系を用いて実施できる。かかる試験系に被検化合物を共存させ、該被検化合物によるTERTのリン酸化が被検化合物の非共存下におけるリン酸化と比較して低減されるまたは消失する場合に、該被検化合物は活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害すると判定できる。

[0092] MAPKAPK3、活性化型MAPKAPK3、不活性化型MAPKAPK3およびTERT等の蛋白質はいずれも、遺伝子工学的手法で発現させた細胞や生体試料から調

製したもの、無細胞系合成産物または化学合成産物であることができ、あるいはさらに精製されたものであることができる。これらはまた、それぞれの蛋白質をコードする遺伝子のうち少なくとも1を含む細胞において発現しているものであることができる。該細胞は、本蛋白質をコードする遺伝子を含むベクターをトランスフェクションして得られた形質転換体であることができる。これらはまた、MAPKAPK3とTERTの結合、および活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化等の機能に影響がなければ、N末端側やC末端側に別の蛋白質やポリペプチド、例えばGST、 β -ガラクトシダーゼ、IgG等の免疫グロブリンFc断片、His-tag、Myc-tag、HA-tag、FLAG-tag、またはXpress-tag等のtagペプチド類を、直接的にまたはリンカーペプチド等を介して間接的に、遺伝子工学的手法等を用いて付加したものであることができる。

[0093] 被検化合物は、例えば化学ライブラリーや天然物由来の化合物、または活性化型MAPKAPK3またはTERTの一次構造や立体構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等が挙げられる。あるいは、MAPKAPK3とTERTの結合部位のアミノ酸配列からなるポリペプチドの構造に基づいてドラッグデザインして得られた化合物等も被検化合物として好適である。

[0094] 本発明の別の一態様は、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害することを特徴とするテロメラーゼ活性化阻害剤およびテロメラーゼ活性阻害剤に関する。本テロメラーゼ活性化阻害剤およびテロメラーゼ活性阻害剤として、好ましくは、MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する化合物、例えば上記化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーゼ活性化阻害剤およびテロメラーゼ活性阻害剤が挙げられる。

[0095] 本発明の別の一態様は、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーゼ活性化阻害剤およびテロメラーゼ活性阻害剤に関する。本テロメラーゼ活性化阻害剤およびテロメラーゼ活性阻害剤として、好ましくは、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物、例えば上記化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーゼ活性化阻害剤およびテロメラーゼ活性阻害剤が挙げられる。より好ましくは、上記MAPKAPK3の不活性化型変異体を含んでなるテロメラーゼ活性化阻害剤、または該不活性化型変異体を含んでなるテロメラー

ス活性化阻害剤が挙げられる。

- [0096] テロメラーズ活性化阻害作用およびテロメラーズ活性阻害作用の確認は、例えばトラップ法(TRAP法:非特許文献27)、ダイレクトテロメラーズアッセイ(Direct telomerase assay:非特許文献28)、ストレッチPCRアッセイ(Stretch PCR assay:非特許文献29)、ハイブリダイゼーションプロテクションアッセイ(Hybridization protection assay:非特許文献30)、TREアッセイ(非特許文献31)、ラピッドダイレクトテロメラーズアッセイ(rapid direct telomerase assay:非特許文献32)等の方法により実施できる。あるいは、これらの確認をパディソンらの方法(非特許文献33)や本明細書の実施例に具体的に記載した方法等に従って実施できる。
- [0097] 本発明の別の態様は、上記化合物および上記阻害剤を含む医薬組成物に関する。上記化合物および上記阻害剤は、生物学的有用性と毒性のバランスを考慮して選別することにより、医薬組成物として調製できる。医薬組成物の調製において、これら化合物や阻害剤は、単独で 사용할ことができ、また、複数を組み合わせて使用することができる。本発明に係る医薬組成物は、テロメラーズの作用やその活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤、並びに当該疾患の防止方法および／または治療方法に利用できる。テロメラーズ活性の亢進に起因する疾患として、例えば癌疾患が挙げられる。
- [0098] テロメラーズは腫瘍の種類に関わらず大多数の腫瘍においてその活性が確認されていることから、本発明に係る医薬組成物は多様な癌細胞の増殖阻害に有効であると考えられる。したがって、本医薬組成物を癌疾患に使用する場合、対象となる腫瘍の種類は特に限定されず、固形腫瘍または非固形腫瘍のいずれにも適用できる。固形腫瘍または非固形腫瘍の種類も特に限定されず、テロメラーズ活性を有するあらゆる種類の腫瘍において適用できる。癌疾患として、胃癌、食道癌、大腸癌、小腸癌、十二指腸癌、肺癌、肝臓癌、胆嚢癌、膵臓癌、腎臓癌、膀胱癌、口腔癌、骨癌、皮膚癌、乳癌、子宮癌、前立腺癌、脳腫瘍、神経芽腫等の固形腫瘍、あるいは白血病や悪性リンパ腫等の非固形腫瘍等を例示できるが、本医薬組成物の適用対象はこれら疾患に限定されない。より好ましくは、さらにMAPKAPK3の活性化やその遺伝子発現の亢進が認められる癌疾患、あるいはMAPKAPK3の活性化に関与する蛋白質の活

性化が認められる癌疾患に適用できる。MAPKAPK3を活性化することが知られているp38が乳癌組織および非小細胞肺癌組織において活性化されていることが報告されている。さらに、MAPKAPK3を活性化することが知られているERKが、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌等の癌組織において活性化されていることが報告されている。したがって、好ましくは、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌および非小細胞肺癌への適用が望ましく、さらに好ましくは乳癌への適用が望ましい。

- [0099] 本発明に係る疾患の防止剤および／または治療剤は、上記化合物および上記阻害剤のうち少なくともいずれか1つを有効成分としてその有効量含む医薬となしてもよいが、通常は、1種または2種以上の医薬用担体を用いて医薬組成物として製造することが好ましい。
- [0100] 本発明に係る医薬製剤中に含まれる有効成分の量は、広範囲から適宜選択される。通常約0.00001～70重量%、好ましくは0.0001～5重量%程度の範囲とするのが適当である。
- [0101] 医薬用担体は、製剤の使用形態に応じて通常使用される、充填剤、増量剤、結合剤、付湿剤、崩壊剤、表面活性剤、滑沢剤等の希釈剤や賦形剤等を例示できる。これらは得られる製剤の投与形態に応じて適宜選択使用される。
- [0102] 例えば水、医薬的に許容される有機溶剤、コラーゲン、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドン、カルボキシビニルポリマー、アルギン酸ナトリウム、水溶性デキストラン、カルボキシメチルスターチナトリウム、ペクチン、キサンタンガム、アラビアゴム、カゼイン、ゼラチン、寒天、グリセリン、プロピレングリコール、ポリエチレングリコール、ワセリン、パラフィン、ステアリルアルコール、ステアリン酸、ヒト血清アルブミン、マンニトール、ソルビトール、ラクトース等が挙げられる。これらは、本発明に係る剤形に応じて適宜1種類または2種類以上を組合せて使用される。
- [0103] 所望により、通常の蛋白質製剤に使用され得る各種の成分、例えば安定化剤、殺菌剤、緩衝剤、等張化剤、キレート剤、pH調整剤、界面活性剤等を適宜使用して調製することもできる。

- [0104] 安定化剤は、例えばヒト血清アルブミンや通常のL-アミノ酸、糖類、セルロース誘導体等を例示できる。これらは単独でまたは界面活性剤等と組合せて使用できる。特にこの組合せによれば、有効成分の安定性をより向上させ得る場合がある。上記L-アミノ酸は、特に限定はなく、例えばグリシン、システイン、グルタミン酸等のいずれでもよい。糖類も特に限定はなく、例えばグルコース、マンノース、ガラクトース、果糖等の単糖類、マンニトール、イノシトール、キシリトール等の糖アルコール、ショ糖、マルトース、乳糖等の二糖類、デキストラン、ヒドロキシプロピルスターチ、コンドロイチン硫酸、ヒアルロン酸等の多糖類等およびそれらの誘導体等のいずれでもよい。セルロース誘導体も特に限定はなく、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、カルボキシメチルセルロースナトリウム等のいずれでもよい。界面活性剤も特に限定はなく、イオン性および非イオン性界面活性剤のいずれも使用できる。これには、例えばポリオキシエチレングリコールソルビタンアルキルエステル系、ポリオキシエチレンアルキルエーテル系、ソルビタンモノアシルエステル系、脂肪酸グリセリド系等が包含される。
- [0105] 緩衝剤は、ホウ酸、リン酸、酢酸、クエン酸、 ϵ -アミノカプロン酸、グルタミン酸および／またはそれらに対応する塩（例えばそれらのナトリウム塩、カリウム塩、カルシウム塩、マグネシウム塩等のアルカリ金属塩やアルカリ土類金属塩）等を例示できる。
- [0106] 等張化剤は、塩化ナトリウム、塩化カリウム、糖類、グリセリン等を例示できる。
- [0107] キレート剤は、例えばエデト酸ナトリウム、クエン酸等を例示できる。
- [0108] 本発明に係る医薬および医薬組成物は、溶液製剤として使用できる。その他、これを凍結乾燥化し保存し得る状態にした後、用時、水や生理的食塩水等を含む緩衝液等で溶解して適当な濃度に調製した後に使用することもできる。
- [0109] 医薬組成物の用量範囲は特に限定されず、含有される成分の有効性、投与形態、投与経路、疾患の種類、対象の性質（体重、年齢、病状および他の医薬の使用の有無等）、および担当医師の判断等応じて適宜選択される。一般的には適当な用量は、例えば対象の体重1kgあたり約0.01 μ g乃至100mg程度、好ましくは約0.1 μ g～1mg程度の範囲であることが好ましい。しかしながら、当該分野においてよく知ら

れた最適化のための一般的な常套的実験を用いてこれらの用量を変更できる。上記投与量は1日1～数回に分けて投与することができ、数日または数週間に1回の割合で間欠的に投与してもよい。

[0110] 本発明の医薬組成物を投与するときは、該医薬組成物を単独で使用してもよく、あるいは目的の疾患の防止および／または治療に必要な他の化合物または医薬と共に使用してもよい。例えば、他のテロメラーズ阻害剤または抗腫瘍用医薬の有効成分等を配合してもよい。

[0111] 投与経路は、全身投与または局所投与のいずれも選択できる。この場合、疾患、症状等に応じた適当な投与経路を選択する。例えば、非経口経路として、通常の静脈内投与、動脈内投与の他、皮下、皮内、筋肉内等への投与が挙げられる。あるいは経口経路で投与できる。さらに、経粘膜投与または経皮投与も実施できる。癌疾患に用いる場合は、腫瘍に直接投与することが好ましい。

[0112] 投与形態は、各種の形態が目的に応じて選択できる。その代表的な例として、錠剤、丸剤、散剤、粉末剤、細粒剤、顆粒剤、カプセル剤等の固体投与形態や、水溶液製剤、エタノール溶液製剤、懸濁剤、脂肪乳剤、リポソーム製剤、シクロデキストリン等の包接体、シロップ、エリキシル等の液剤投与形態が含まれる。これらはさらに投与経路に応じて経口剤、非経口剤（点滴剤、注射剤）、経鼻剤、吸入剤、経膈剤、坐剤、舌下剤、点眼剤、点耳剤、軟膏剤、クリーム剤、経皮吸収剤、経粘膜吸収剤等に分類され、それぞれ通常の方法に従い、調合、成形、調製することができる。

[0113] 本発明の一態様は、MAPKAPK3、MAPKAPK3をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、および該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、TERT、TERTをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクター、および該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなるキットに関する。当該キットは、例えば本発明に係る同定方法に使用できる。好ましくは、MAPKAPK3として活性化型MAPKAPK3を使用できる。

[0114] ポリヌクレオチドは、例えばヒトcDNAライブラリーから自体公知の遺伝子工学的手法により調製できる。ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有す

る形質転換体は、当該ポリヌクレオチドを適当な発現ベクター、例えば細菌プラスミド由来のベクターに自体公知の遺伝子工学的手法で導入することにより、また得られたベクターを周知の方法で適当な細胞にトランスフェクションすることにより取得できる。

[0115] 上記キットは、MAPKAPK3または活性化型MAPKAPK3とTERTとの結合、または活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を検出するためのシグナルおよび／またはマーカー、緩衝液、並びに塩等、必要とされる物質を含むことができる。さらに、安定化剤および／または防腐剤等の物質を含んでいてもよい。製剤化にあたっては、使用する各物質それぞれに応じた製剤化手段を導入すればよい。

[0116] 以下、本発明を実施例に基づき具体的に説明するが、本発明は下記の実施例に限定されない。

実施例 1

[0117] (TERTと相互作用する機能を有する蛋白質のインシリコでの探索)

テロメラーズの触媒サブユニットであるTERTと相互作用する機能を有する蛋白質の予測を、特許文献1に記載のインシリコでの予測方法に従って次のように予測した：i) TERTのアミノ酸配列をある長さのオリゴペプチドに分解し、ii) 各オリゴペプチドのアミノ酸配列あるいはそのアミノ酸配列と相同なアミノ酸配列を持った蛋白質をデータベース中で検索し、iii) 得られた蛋白質とTERTとの間でローカルアライメントを行い、iv) ローカルアライメントのスコアの高いものをTERTと相互作用すると予測する。

[0118] 解析の結果(図1)、TERTと相互作用する機能を有すると予測される蛋白質として、MAPKAPK3を見出した。

実施例 2

[0119] (TERTとMAPKAPK3のインビトロにおける結合解析)

TERTとMAPKAPK3が結合するか否かを、GST-pull down法によるインビトロ結合試験により検討した。MAPKAPK3として、MAPKAPK3、活性化型MAPKAPK3および不活性化型MAPKAPK3をそれぞれ使用した。

[0120] <材料およびその調製>

TERT発現プラスミドの構築

ヒトTERT cDNAはヒト胸腺cDNA(Clontech社製)からPCRにより獲得した。ヒトTERT cDNAを動物細胞用発現ベクターpCIneo(Promega社製)へ組込むことにより、動物細胞用TERT発現プラスミドを構築した。

[0121] MAPKAPK3発現プラスミドの構築

ヒトMAPKAPK3 cDNAはヒト骨格筋cDNA(Clontech社製)からPCRにより獲得した。ヒトMAPKAPK3 cDNAを、大腸菌でのGST融合蛋白質発現用ベクターであるpGEX-4T(Amersham Bioscience社製)へ組込むことにより、大腸菌用N末端GST融合MAPKAPK3発現プラスミドを構築した。

[0122] 活性化型および不活性化型MAPKAPK3発現プラスミドの構築

N末端にGSTを融合させた活性化型MAPKAPK3発現プラスミドを構築するために、上記MAPKAPK3 cDNAに、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンが共にグルタミン酸に置換されるように変異を導入した。変異が導入されたMAPKAPK3 cDNAを大腸菌でのGST融合蛋白質発現用ベクターであるpGEX-4Tへ組込むことにより、N末端にGSTを融合させた活性化型MAPKAPK3発現プラスミドを構築した。また、N末端にGSTを融合させた不活性化型MAPKAPK3発現プラスミドを構築するために、上記MAPKAPK3 cDNAに、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンが共にアラニンに置換されるように変異を導入した。変異が導入されたMAPKAPK3 cDNAを大腸菌でのGST融合蛋白質発現用ベクターであるpGEX-4Tへ組込むことにより、N末端にGSTを融合させた不活性化型MAPKAPK3発現プラスミドを構築した。

[0123] 各プラスミドを用いた蛋白質の調製

TERTは、TNT quick coupled transcription/translation systems(Promega社製)を使用してインビトロにて³⁵S-メチオニン標識した蛋白質として合成した。

GST融合MAPKAPK3(GST-MAPKAPK3)、GST融合活性化型MAPKAPK3(活性化型GST-MAPKAPK3)およびGST融合不活性化型MAPKAPK3(不活性化型GST-MAPKAPK3)は、上記構築した各プラスミドを用いて大腸菌

にトランスフェクションして発現誘導後、グルタチオンセファロースで精製して使用した。

[0124] 各GST-MAPKAPK3の活性確認

それぞれ5 μ gのGST-MAPKAPK3、活性化型GST-MAPKAPK3、不活性化型GST-MAPKAPK3またはGSTと、基質として2 μ gのHSP27 (Upstate社製)とを5 μ Ciの[γ -³²P]ATP (3,000 Ci/mmol, PerkinElmer社製)を含む20 μ lのリン酸化バッファー (25mM Tris-HCl, pH7.5/5mM β -グリセロホスフェート (β -glycerophosphate)/2mM ジチオスレイトール (DTT)/0.1mM Na₃VO₄/10mM MgCl₂/10 μ M ATP) 中にて、30℃で15分間インキュベーションすることによりリン酸化反応を行った。反応後、20 μ lの2×SDS サンプルバッファー (4% SDS/125mM Tris HCl, pH6.8/20% グリセロール/0.01% BPB/10% β -メルカプトエタノール) を反応液に加え、100℃で5分間処理した。次いで、5-20% SDS-PAGEにより蛋白質を分離し、BAS2000 (Fuji film 社製) を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化されたHSP27を検出した。

[0125] <方法>

GST-pull down法による結合試験

TERT合成反応液の20 μ lとGST-MAPKAPK3、活性化型GST-MAPKAPK3または不活性化型GST-MAPKAPK3の5 μ gとを、500 μ lのバインディングバッファー (20mM Tris-HCl, pH8.0/140mM NaCl/1 mM エチレンジリコールビス四酢酸 (EGTA)/1mM DTT/1% TritonX-100/10% グリセロール) 中にて、氷上、1時間静置した。その後、20 μ lのグルタチオンセファロース 4B (Glutathione sepharose 4B) を添加し、4℃にて一晩、転倒混和した後、遠心処理によりセファロースビーズを回収した。セファロースビーズを500 μ lのバインディングバッファーで4回洗浄した後、20 μ lの2×SDS サンプルバッファー (125mM Tris-HCl, pH6.8/4% SDS/20% グリセロール/0.01% プロモフェノールブルー (BPB)) を加え、3分間煮沸後、上清を5-20% SDS-PAGEにより分離した。その後、FLA3000 (Fuji film社製) によりTERTを検出した。陰性コントロールとして、各MAPKAPK3の代わりにGSTを用い、上記同様の処理を行なった。

。また、SDS-PAGEによるTERT検出のコントロールとして、³⁵S-メチオニン標識したTERTを用いた。

[0126] <結果>

GST-MAPKAPK3、活性化型GST-MAPKAPK3および不活性化型GST-MAPKAPK3はいずれも、インビトロでTERTと結合した(図2)。一方、GSTとTERTとの結合は認められなかった。この結果から、各GST-MAPKAPK3とTERTとの結合は特異的であると言える(図2)。

[0127] GST-MAPKAPK3、活性化型GST-MAPKAPK3および不活性化型GST-MAPKAPK3はいずれも、TERTと直接結合することが明らかになった。

実施例 3

[0128] (TERTとMAPKAPK3の細胞内における結合解析)

TERTとMAPKAPK3が細胞内において結合するか否かを、細胞内共発現/免疫共沈降法による結合試験により検討した。

[0129] <材料>

MAPKAPK3発現プラスミドの構築

ヒトMAPKAPK3 cDNAはRT-PCRにより獲得し、動物細胞用発現ベクターpcDNA3.1(+) (Invitrogen社製)へ組込んだ。その際、5'側にHA-tagコード配列を挿入し、動物細胞用N末端HA-tag付加型MAPKAPK3発現プラスミドを構築した。

[0130] TERT発現プラスミドは、実施例2で作製したプラスミドを用いた。

[0131] <方法>

トランスフェクションおよび免疫共沈降法による結合試験

細胞数 4×10^5 のHEK293T細胞を5%CO₂存在下にて37℃で一晩培養した後(直径60mmシャーレ)、2μgのHA-tag付加型MAPKAPK3発現プラスミドまたは陰性コントロールとしてpcDNA3.1(+)を2μgのTERT発現プラスミドと共に、FuGENE6 Transfection Reagent(Roche社製)を用いてトランスフェクションした。2日間培養後、細胞を氷冷したリン酸緩衝生理食塩水(PBS(-))で洗浄して回収後、500μlの細胞溶解バッファー(20mM Tris-HCl、pH7.4/150mM NaCl

1/1mM エチレンジアミン四酢酸(EDTA)/1mM EGTA/1% Triton X-100/2.5mM ピロホスフェートナトリウム(sodium pyrophosphate)/1mM β -グリセロホスフェート/1mM Na_3VO_4 /プロテアーゼ阻害剤カクテル(protease inhibitor cocktail))に懸濁し、氷上で10分間放置した。その後、4°C、14,000 rpmで10分間の遠心処理により上清を回収し、細胞溶解液として用いた。次に、500 μ lの細胞溶解液に10 μ lのアガロース結合正常ウサギIgG (Agarose-conjugated normal rabbit IgG、Sigma社製)を加え、4°Cにて30分間転倒混和した後、遠心処理により上清を回収した。回収した上清に10 μ lのアガロース結合抗HA抗体(Y-11、SantaCruz社製)を加え、4°Cにて一晩転倒混和した後、遠心処理によりアガロースビーズを回収した。アガロースビーズを500 μ lの細胞溶解バッファーで4回洗浄した後、25 μ lの2×SDS サンプルバッファーを加え、5分間加熱後、上清を5-20% SDS-PAGEにより分離した。その後、抗TERT抗体(L-20、SantaCruz社製)を用いたウェスタンブロットティングにより結合蛋白質を検出した。なお、検出はECL western blotting detection kit(Amersham biosciences社製)を使用して行なった。

[0132] <結果>

TERTとHA-tag付加型MAPKAPK3(HA-MAPKAPK3)を共発現させた細胞の細胞溶解液について、抗HA抗体で免疫沈降した後に抗TERT抗体でウェスタンブロットティングを行なった結果、バンドが検出された(図3におけるレーン2の下段パネル)。一方、TERTのみを発現させた細胞の細胞溶解液について、同様に免疫沈降およびウェスタンブロットティングを行った結果、バンドは検出されなかった(図3におけるレーン1の下段パネル)。細胞におけるHA-MAPKAPK3およびTERTの発現は、それぞれ抗HA抗体および抗TERT抗体を用いたウェスタンブロットティングにより確認した(図3におけるレーン1および2の上段パネルおよび中段パネル)。

[0133] この結果から、TERTがHA-MAPKAPK3と共沈降することが明らかになった。すなわち、TERTとMAPKAPK3が細胞内で結合することが明らかになった。

実施例 4

[0134] (MAPKAPK3一過性発現による細胞内テロメラーゼ活性の上昇)

テロメラーゼ陽性細胞であるHEK293T細胞へのMAPKAPK3の一過性発現により細胞内テロメラーゼ活性が変動するか否かについて検討した。

[0135] <材料>

MAPKAPK3発現プラスミドは、実施例3で構築した動物細胞用N末端HA-tag付加型MAPKAPK3発現プラスミドを用いた。このHA-tag付加型MAPKAPK3発現プラスミドを基に、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンが共にグルタミン酸に置換されるように変異を導入することにより、N末端にHA-tagが付加された活性化型MAPKAPK3発現プラスミドを構築した。また、N末端にHA-tagが付加された不活性化型MAPKAPK3発現プラスミドを、上記HA-tag付加型MAPKAPK3発現プラスミドを基に、MAPKAPK3のアミノ酸配列第201番目と第313番目のスレオニンが共にアラニンに置換されるように変異を導入することにより構築した。また、陰性コントロールとしてpcDNA3.1(+)を使用した。

[0136] <方法>

トランスフェクションおよびTRAP法による細胞内テロメラーゼ活性の測定

細胞数 2×10^4 のHEK293T細胞を5%CO₂存在下にて37℃で一晩培養した後(24wellプレート)、各0.2μgの発現プラスミドをそれぞれFuGENE6 Transfection Reagent(Roche社製)を用いてトランスフェクションした。48時間培養後、細胞を回収し、TRAPEZE XL Kit(Intergen社製)を用いたTRAP法により細胞内テロメラーゼ活性を測定した。

[0137] 具体的には、細胞を100μlの1× CHAPS 細胞溶解バッファー(10mM Tris-HCl, pH7.5/1mM MgCl₂/1mM EGTA/0.1mM ベンズアミジン(Benzamidine)/5mM β-メルカプトエタノール/0.5% CHAPS/10% グリセロール)に懸濁し、30分間氷上で静置した後、遠心処理して上清を回収し、細胞溶解液として用いた。細胞溶解液中の蛋白質濃度をCoomassie Plus-200 Protein Assay Reagent(Pierce社製)で測定後、蛋白質量5ngの細胞溶解液を用いてTRAP反応を行った。

[0138] TRAP反応は、まず30℃で30分間のテロメラーゼ反応を行った後、生成したテロメアリピート配列の増幅をPCR反応により行った。PCR反応は、94℃で30秒間、59℃

で30秒間、72℃で1分間を36サイクル行なった後、55℃で25分間反応させることにより実施した。その後、PCR反応液の蛍光強度を測定することによりテロメラーゼ活性の強度を測定した。蛍光強度の測定は、PCRに用いたプライマーに標識されたフルオレセイン(テロメラーゼ反応産物の指標)およびスルホローダミン(内部標準の指標)の各蛍光強度を、蛍光分光光度計F-2000(Hitachi)を使用し、測定波長(λ_{Ex} / λ_{Em})485nm/535nmおよび585nm/620nmで計測することにより行なった。その際、反応液23 μ lを600 μ lの測定用希釈液(10mM Tris-HCl, pH7.4/0.15M NaCl/2mM $MgCl_2$)で希釈して測定した。テロメラーゼ活性は、内部標準との比($\Delta FL/\Delta RL$)により表した。

[0139] 免疫複合体キナーゼ試験によるMAPKAPK3活性の確認

細胞数 2×10^5 のHEK293T細胞を5%CO₂存在下にて37℃で一晩培養した後(6cmシャーレ)、各2 μ gの発現プラスミドをそれぞれFuGENE6 Transfection Reagent(Roche社製)を用いてトランスフェクションした。48時間培養後、細胞を回収し、500 μ lの細胞溶解バッファー(実施例3で用いた細胞溶解バッファーと同組成)に懸濁し、氷上で20分間放置した。その後、4℃で、14,000rpm、10分間の遠心処理により上清を回収し、細胞溶解液として用いた。次に、500 μ lの細胞溶解液に10 μ lのアガロース結合正常マウスIgG(Sigma社製)を加え、4℃にて30分間転倒混和した後、遠心処理により上清を回収した。回収した上清に10 μ lのAnti-HA Affinity Matrix(Roche社製)を加え、4℃にて2時間転倒混和した後、遠心処理によりアガロースビーズを回収し、さらにアガロースビーズを500 μ lの細胞溶解バッファーで2回、500 μ lのキナーゼバッファー(25mM Tris-HCl, pH7.5/5mM β -グリセロホスフェート/2mM DTT/0.1mM Na_3VO_4 /10mM $MgCl_2$)で2回洗浄した。次に、ビーズに2 μ gのHSP27(Upstate社製)と10 μ M ATPおよび5 μ Ciの[γ -³²P]ATP(3,000Ci/mmol, PerkinElmer社製)を含む20 μ lのキナーゼバッファーを加え、30℃にて30分間リン酸化反応を行った。反応後、20 μ lの2×SDS サンプルバッファーを加え、5分間煮沸後、上清をSDS-PAGEにより分離し、FLA3000(Fuji film社製)を用いたオートラジオグラフィーによりリン酸化されたHSP27を検出した。

[0140] <結果>

テロメラーゼ活性を有するHEK293T細胞に活性化型MAPKAPK3を一過性発現させたときに、陰性コントロールであるベクターをトランスフェクションしたときと比較して、細胞内テロメラーゼ活性の上昇が認められた(約1.4倍、図4)。活性化型MAPKAPK3の一過性発現によるテロメラーゼ活性の上昇は、スチューデント t-テストで有意差($p < 0.01$)が認められた。それに対し、HEK293T細胞にMAPKAPK3を一過性発現させたときには細胞内テロメラーゼ活性の変化は殆ど認められなかった。

[0141] 一方、HEK293T細胞に不活性化型MAPKAPK3を一過性発現させたときは、細胞内テロメラーゼ活性の低減が認められた(約0.7倍)。

[0142] 一過性発現させた各MAPKAPK3のキナーゼ活性をHSP27を基質として用いたリン酸化試験で測定した結果、活性化型MAPKAPK3においてのみキナーゼ活性が認められた。

[0143] 上記結果から、HEK293T細胞のテロメラーゼ活性が活性化型MAPKAPK3の一過性発現により促進されること、およびMAPKAPK3によるテロメラーゼ活性の促進効果はMAPKAPK3のキナーゼ活性に依存することが明らかになった。

[0144] また、HEK293T細胞のテロメラーゼ活性が不活性化型MAPKAPK3の一過性発現により低減されることが明らかになった。不活性化型MAPKAPK3はTERTと結合する(実施例2を参照)が、そのキナーゼ活性は低減または消失している。このことから、不活性化型MAPKAPK3は、内因性のMAPKAPK3のTERTへの結合を拮抗的に阻害することによりテロメラーゼの活性化を阻害し、その結果、テロメラーゼ活性を低減させたと考える。

実施例 5

[0145] (MAPKAPK3によるテロメラーゼ活性の上昇/HEK293細胞核抽出液を用いたインビトロ系での検討)

細胞抽出液を脱リン酸化処理することにより抽出液中のテロメラーゼ活性が低減されることが報告されている。このことから、テロメラーゼの活性化におけるリン酸化の必要性が示唆されている。そこで、HEK293細胞核抽出液を用いて核抽出液中のテロメ

レース活性に対する脱リン酸化処理の影響について検討した。さらに、HEK293細胞核抽出液中のテロメレース活性が、精製したMAPKAPK3との反応により変化するか否かについて検討した。

[0146] <材料>

MAPKAPK3の調製と活性確認

GST-MAPKAPK3、活性化型GST-MAPKAPK3および不活性化型GST-MAPKAPK3は、実施例2に記載の方法と同様の方法で調製した。また、各MAPKAPK3の活性は、実施例2に記載の方法で確認した。

[0147] HEK293細胞核抽出液の調製

HEK293細胞を400 μ LのバッファーA (10mM Hepes-KOH, pH8.0 / 10mM KCl / 0.1mM EDTA / 0.1mM EGTA / 1mM DTT / プロテアーゼ阻害剤カクテル) に懸濁し、氷上で15分間放置後、25 μ Lの10% ノニデット P-40を加えてさらに氷上で10分間放置した。その後、4℃で14,000rpm, 5分間の遠心処理により沈降した核を回収した。沈殿した核に100 μ LのバッファーC (20mM Hepes-KOH, pH8.0 / 400mM NaCl / 1mM EDTA / 1mM EGTA / 1mM DTT / プロテアーゼ阻害剤カクテル) を加えてよく攪拌し、氷上で15分放置後、4℃で14,000rpm, 5分間の遠心処理により上清を回収し、核抽出液として用いた。その後、回収した核抽出液にバッファーD (20mM Hepes-KOH, pH8.0 / 0.2mM EDTA) を加え、核抽出液中のNaClの最終濃度を150mMにした。核抽出液は使用時まで-80℃で保存した。

[0148] <方法>

HEK293細胞核抽出液の脱リン酸化処理および核抽出液内テロメレース活性の測定

蛋白質量2000ngのHEK293細胞核抽出液に500、100、20、4、0.8、0、unitのホスファターゼ、アルカリーアガロース (CIP-Agarose, Sigma社製) を加え、20 μ lの反応バッファー (50mM Tris-HCl, pH8.0 / 1mM $MgCl_2$) 中で30℃で30分間脱リン酸化反応を行った。その後、遠心処理上清1 μ lを上記反応バッファーで20 μ lに希釈し、そのうち1 μ lを用いてTRAP反応を行い、テロメレース活性を測

定した。

- [0149] HEK293細胞核抽出液中のテロメラーゼ活性に対するMAPKAPK3の影響についての検討

上記と同様の方法でHEK293細胞核抽出液を脱リン酸化処理後、遠心処理上清1 μ lに100、50、25、12.5、6.25 pmolの活性化型GST-MAPKAPK3またはGSTを加え、20 μ lの反応系(25mM Tris-HCl, pH7.5/5mM β -グリセロホスフェート/2mM DTT/0.1mM Na_3VO_4 /10mM MgCl_2 /0.1mM ATP)にて30°Cで30分間リン酸化反応を行った。その後、反応液1 μ lを用いてTRAP反応を行い、テロメラーゼ活性を測定した。活性化型GST-MAPKAPK3の代わりにMAPKAPK3または不活性化型GST-MAPKAPK3をリン酸化反応に用いるときは、それぞれ100 pmolを使用した。

- [0150] <結果>

脱リン酸化処理により、脱リン酸化酵素であるホスファターゼ、アルカリーアガロースの用量依存的に、テロメラーゼ活性の低減が認められた(図5)。この結果から、HEK293細胞核抽出液中のテロメラーゼがリン酸化依存的に活性化されていることが判明した。

- [0151] 脱リン酸化処理によりテロメラーゼ活性が低減した核抽出液に活性化型MAPKAPK3を添加してリン酸化反応を行なった。その結果、活性化型MAPKAPK3用量依存的にテロメラーゼ活性が上昇した(最大約1.5倍、図6)。それに対し、GSTを添加して同様にリン酸化反応を行なったときは、テロメラーゼ活性の上昇は認められなかった。また、MAPKAPK3または不活性化型MAPKAPK3を添加して同様にリン酸化反応を行なったときには、テロメラーゼ活性の変化は認められなかった(図7)。

- [0152] 精製した各MAPKAPK3のキナーゼ活性をHSP27を基質として用いたリン酸化試験で測定した結果、活性化型MAPKAPK3においてのみキナーゼ活性が認められた。

- [0153] これら結果から、インビトロにおいてもMAPKAPK3がそのキナーゼ活性依存的にテロメラーゼ活性を上昇させることが明らかになった。

実施例 6

[0154] (不活性化型MAPKAPK3過剰発現によるテロメラーゼ活性の阻害およびテロメア長短縮の検討)

癌細胞株において不活性化型MAPKAPK3過剰発現によりテロメラーゼ活性が阻害されるか否かおよびテロメア長が短出されるか否かを検討した。

[0155] 不活性化型MAPKAPK3は、ドミナントネガティブ効果を有し、内因性のMAPKAPK3の作用を阻害すると考える。実際、不活性化型MAPKAPK3は、TERTと結合し(実施例2および図2を参照)、HEK293T細胞に一過性発現させたときに細胞内テロメラーゼ活性を低減させた(実施例4および図4を参照)。

[0156] 不活性化型MAPKAPK3は、組換えレトロウイルスを利用し、癌細胞株において安定的に過剰発現させた。

[0157] テロメラーゼ活性の測定はTRAP法により実施した。また、テロメラーゼ活性の阻害はテロメア長の短縮を誘導すると考えられることから、不活性化型MAPKAPK3を安定に過剰発現させた癌細胞株のテロメア長の測定を行った。

[0158] <材料と方法>

不活性化型MAPKAPK3発現用組換えレトロウイルスベクターの構築

p38によるリン酸化部位である201番目と313番目のスレオニンのコドンそれぞれアラニンのコドンに置換したMAPKAPK3 cDNA(5'側にHA-tagコード配列を挿入)をレトロウイルスベクターであるpQCXIP(Clontech社製)に組込むことにより、不活性化型MAPKAPK3発現用組換えレトロウイルスベクターを構築した。本ベクターにより発現されるMAPKAPK3は、p38によるリン酸化を受けないために活性化されず、そのためキナーゼ活性を示さない。また、本ベクターにより発現されるMAPKAPK3は、そのN末端にHA-tagが付加されている。

[0159] 組換えレトロウイルスの作製

細胞数 2×10^6 のHEK293T細胞を5%CO₂存在下にて37℃で一晩培養した後(60mmシャーレ)、2 μ gの不活性化型MAPKAPK3発現用組換えレトロウイルスベクターを各2 μ gのpVPack-GPおよびpVPack-VSV-G(共にStratagene社製)と共に、FuGENE6 Transfection Reagent(Roche社製)を用いてトランスフェクションした。2日間培養後、培養上清を回収し、0.45 μ mフィルターでろ過した

後、ウイルス液として用いた。陰性コントロールとして不活性化型MAPKAPK3 cDNAを組み込んでいないpQCXIPを用い、同様に処理してウイルス液(以下空ウイルスと称する)を得た。

[0160] 培養細胞への組換えレトロウイルスの感染

癌細胞株として、ヒト前立腺癌由来細胞株PC-3およびヒト神経膠芽腫由来細胞株U-87MGを用いた。PC-3およびU-87MGをそれぞれ12ウェルプレートにて一晩培養した後(約10% コンフリュエンス(confluency))、培地を8 μ g/mlのポリブレン(Sigma社製)を含むウイルス液(350 μ l/well)に置換した。24~36時間培養後、2.5 μ g/mlのピューロマイシンを含む培地に交換し、ウイルス感染細胞の選択培養を開始した。一週間以上選択培養後、ウェスタンブロッティングによる発現蛋白質の検出およびTRAP法によるテロメラーゼ活性の測定を実施した。なお、ウイルス感染細胞は、その後も選択培地にて継代維持した。

[0161] ウェスタンブロッティング

細胞をSDSサンプルバッファー(125mM Tris-HCl, pH6.8/4% SDS/20% グリセロール/0.01% BPB)に懸濁し、超音波処理後、5分間煮沸したものを細胞抽出液として用いた。細胞抽出液を5-20% SDS-PAGEにより分離した後、抗HAポリクローナル抗体(Y-11, Santa Cruz社製)を用いたウェスタンブロッティングにより、不活性化型MAPKAPK3の検出を行った。また、コントロールとして、抗 β -チューブリンポリクローナル抗体(SantaCruze社製)を用いて β -tubulinの検出を行った。

[0162] TRAP法によるテロメラーゼ活性の定量

細胞内テロメラーゼ活性は、TRAPEZE XL Kit(Intergen社製)を用い、実施例4に記載した方法と同様の方法(TRAP法)で測定した。ただし、細胞溶解バッファーは、次に示す組成のものを用いた:10mM Tris-HCl, pH 7.5/1mM MgCl₂/1mM EGTA/0.1mM Benzamidine/5mM β -メルカプトエタノール/0.5% CHAPS/10% グリセロール/5mM ピロリン酸ナトリウム/1mM β -グリセロホスフェート/1mM Na₃VO₄/1mM NaF。また、蛋白質量40ngの細胞溶解液を用いてTRAP反応を行った。

[0163] 培養細胞からのゲノムDNAの抽出

ヒト神経膠芽腫由来細胞株U-87MGからゲノムDNAを抽出し、テロメア長の測定に用いた。ゲノムDNAの抽出は、Blood & Cell Culture DNA Mini Kit (Qiagen社製)を用い、添付の説明書に従い実施した。

[0164] テロメア長の測定

テロメア長の測定は、Terminal restriction fragments (TRF) 解析法により実施した。具体的には、テロメア長の測定は、TeloTAGGG Telomere Length Assay Kit (Roche社製)を用い、添付の説明書に従い実施した。即ち、HinfIおよびRsaIで消化した2 μ gのゲノムDNAを0.8%アガロースゲル電気泳動により分離後、ナイロンメンブレン (positively-charged、Roche社製) に20×SSC存在下にてキャピラリートランスファーした。トランスファー後のメンブレンを120℃で30分間ベイクし、DNAを固定した。次に、メンブレンをキットに付属のDIG Easy Hyb液中にてプレハイブリダイゼーションした後、ジゴキシゲニン (DIG) 標識されたテロメアプローブ (キットに付属) を加え、42℃にて3時間以上ハイブリダイゼーションを行った。メンブレンを洗浄後、アルカリホスファターゼ標識抗DIG抗体およびCDP-Star (共にキットに付属) を用いた化学発光法によりTRFのシグナルを検出した。

[0165] <結果>

不活性化型MAPKAPK3発現レトロウイルス感染細胞 (inactive 3pK) において、親株 (parent) または空ウイルス感染細胞 (empty) と比較して、テロメラーゼ活性が顕著に低減した (図8-A)。不活性化型MAPKAPK3発現レトロウイルス感染細胞 (inactive 3pK) において不活性化型MAPKAPK3が過剰発現されていることはウェスタンブロットにより確認された。 (図8-B)。すなわち、不活性化型MAPKAPK3発現レトロウイルス感染細胞は、不活性化型MAPKAPK3を安定的に過剰発現している。

[0166] 不活性化型MAPKAPK3発現レトロウイルス感染細胞において経時的なテロメア長の短縮が認められた (図9)。特に、感染38日後では、親株 (parent) および空ウイルス感染細胞 (empty) と比較して明らかなテロメア長短縮が認められた (図9)。一方、親株 (parent) および空ウイルス感染細胞 (empty) においてはテロメア長の変化は

認められなかった(図9)。

- [0167] これら結果から、不活性化型MAPKAPK3過剰発現によりテロメラーゼ活性が阻害され、それによりテロメア長の短縮が引き起こされることが明らかになった。
- [0168] 不活性化型MAPKAPK3はTERTと結合する(実施例2を参照)が、そのキナーゼ活性は低減または消失している。このことから、不活性化型MAPKAPK3は、内因性のMAPKAPK3のTERTへの結合を拮抗的に阻害することによりテロメラーゼの活性化を阻害し、それによりテロメラーゼ活性の低減とテロメア長の短縮を引き起こしたと考える。

産業上の利用可能性

- [0169] 本発明によれば、テロメラーゼの活性化またはテロメラーゼの活性を阻害する化合物の同定方法を提供できる。また、本発明によれば、テロメラーゼの活性化またはテロメラーゼの活性を阻害できる。さらに、テロメラーゼの作用やその活性の亢進に起因する疾患の防止および／または治療を期待できる。テロメラーゼが癌の種類を問わずほとんどの癌細胞で発現しており、生殖細胞以外の正常体細胞ではほとんど発現していないことから、本発明は例えば、多様な癌疾患の防止および／または治療に有効であると考えられる。
- [0170] このように本発明は、テロメラーゼが関与する細胞増殖や細胞老化のメカニズムおよびテロメラーゼの作用やその活性の亢進に起因する疾患等に関する基礎的研究等に有用である。さらにテロメラーゼの作用やその活性の亢進に起因する疾患、例えば癌疾患の防止および／または治療に非常に有用である。

配列表フリーテキスト

- [0171] 配列番号1:MAPKAPK3(配列番号2)をコードするポリヌクレオチド。
配列番号3:TERT(配列番号4)をコードするポリヌクレオチド。
配列番号5:MAPKAPK3(配列番号2)の第201番目および第313番目のアミノ酸残基が共にスレオニンからアラニンに置換した不活性化型変異体をコードするポリヌクレオチド。
配列番号6:MAPKAPK3(配列番号2)の第201番目および第313番目のアミノ酸残基が共にスレオニンからアラニンに置換した不活性化型変異体。

配列番号7:MAPKAPK3(配列番号2)の第201番目および第313番目のアミノ酸残基が共にスレオニンからグルタミン酸に置換した活性化型変異体をコードするポリヌクレオチド。

配列番号8:MAPKAPK3(配列番号2)の第201番目および第313番目のアミノ酸残基が共にスレオニンからグルタミン酸に置換した活性化型変異体。

配列番号9:MAPKAPK3(配列番号2)の部分配列と高い相同性を有する、TERT(配列番号4)の部分配列。

配列番号10:TERT(配列番号4)の部分配列と高い相同性を有する、MAPKAPK3(配列番号2)の部分配列。

配列番号11:MAPKAPK3(配列番号2)の部分配列と高い相同性を有する、TERT(配列番号4)の部分配列。

配列番号12:TERT(配列番号4)の部分配列と高い相同性を有する、MAPKAPK3(配列番号2)の部分配列。

配列番号13:TERT(配列番号4)およびMAPKAPK3(配列番号2)の配列において、同一の部分配列。

請求の範囲

- [1] 以下の群より選ばれるテロメラーゼ活性化阻害方法:
(i) MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) と TERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害することを特徴とするテロメラーゼ活性化阻害方法
および
(ii) 活性化型 MAPKAPK3 による TERT のリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーゼ活性化阻害方法。
- [2] MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) と TERT (telomerase reverse transcriptase) の結合を阻害することを特徴とするテロメラーゼ活性化阻害方法。
- [3] 請求項1または2に記載のテロメラーゼ活性化阻害方法を用いることを特徴とするテロメラーゼ活性阻害方法。
- [4] MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) の不活性化型変異体によるテロメラーゼ活性阻害方法であって、該変異体が TERT (telomerase reverse transcriptase) と結合する変異体である、テロメラーゼ活性阻害方法。
- [5] MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3) の不活性化型変異体が配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である、請求項4に記載のテロメラーゼ活性阻害方法。
- [6] 請求項1若しくは2に記載のテロメラーゼ活性化阻害方法、および／または請求項3から5のいずれか1項に記載のテロメラーゼ活性阻害方法を用いることを特徴とするテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。
- [7] テロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患が、癌疾患である請求項6に記載のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。
- [8] 癌疾患が、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌および非小細胞肺癌のいずれかである請求項7に記載のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療

方法。

- [9] 癌疾患が乳癌疾患である請求項7に記載のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止方法および／または治療方法。
- [10] MAPKAPK3(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)とTERT(telomerase reverse transcriptase)の結合を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物とMAPKAPK3および／またはTERTとの相互作用を可能にする条件下、該化合物とMAPKAPK3および／またはTERTとを接触させ、次いで、MAPKAPK3とTERTの結合により生じるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、該シグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、該化合物がMAPKAPK3とTERTの結合を阻害するか否かを決定する方法。
- [11] 活性化型MAPKAPK3(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)によるTERT(telomerase reverse transcriptase)のリン酸化を阻害する化合物の同定方法であって、ある化合物と活性化型MAPKAPK3および／またはTERTとの相互作用を可能にする条件下、該化合物と活性化型MAPKAPK3および／またはTERTとを接触させ、次いで、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化により生じるシグナルおよび／またはマーカーを使用する系を用いて、該シグナルおよび／またはマーカーの存在若しくは不存在または変化を検出することにより、該化合物が活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害するか否かを決定する方法。
- [12] 以下の群より選ばれるテロメラーゼ活性化阻害剤：
(i) MAPKAPK3(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)とTERT(telomerase reverse transcriptase)の結合を阻害することを特徴とするテロメラーゼ活性化阻害剤
および
(ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーゼ活性化阻害剤。
- [13] 以下の群より選ばれるテロメラーゼ活性化阻害剤：

- (i) MAPKAPK3(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)とTERT(telomerase reverse transcriptase)の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーズ活性化阻害剤
および
- (ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーズ活性化阻害剤。
- [14] 以下の群より選ばれるテロメラーズ活性阻害剤:
- (i) MAPKAPK3(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)とTERT(telomerase reverse transcriptase)の結合を阻害することを特徴とするテロメラーズ活性阻害剤
および
- (ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害することを特徴とするテロメラーズ活性阻害剤。
- [15] 以下の群より選ばれるテロメラーズ活性阻害剤:
- (i) MAPKAPK3(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)とTERT(telomerase reverse transcriptase)の結合を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーズ活性阻害剤
および
- (ii) 活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する化合物を少なくとも1つ含んでなるテロメラーズ活性阻害剤。
- [16] MAPKAPK3(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)の不活性化型変異体を含んでなるテロメラーズ活性阻害剤であって、該変異体がTERT(telomelase reverse transcriptase)と結合する変異体である、テロメラーズ活性阻害剤。
- [17] MAPKAPK3(mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)の不活性化型変異体が配列表の配列番号6に記載のアミノ酸配列で表される蛋白質である、請求項16に記載のテロメラーズ活性阻害剤。
- [18] 請求項1若しくは2に記載のテロメラーズ活性化阻害方法を用いるテロメラーズ活性

化阻害、および／または請求項3から5のいずれか1項に記載のテロメラーゼ活性阻害方法を用いるテロメラーゼ活性阻害を特徴とするテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。

- [19] 請求項12および13に記載のテロメラーゼ活性化阻害剤並びに請求項14から17に記載のテロメラーゼ活性阻害剤のうち少なくともいずれか1つを含んでなるテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。
- [20] テロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患が、癌疾患である請求項18または19に記載のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。
- [21] 癌疾患が、乳癌、腎細胞癌、急性白血病、グリア性腫瘍、前立腺癌、神経上皮腫、扁平上皮癌、肝細胞癌、前立腺癌および非小細胞肺癌のいずれかである請求項20に記載のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。
- [22] 癌疾患が乳癌疾患である請求項20に記載のテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止剤および／または治療剤。
- [23] MAPKAPK3 (mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase-3)、MAPKAPK3をコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つと、TERT (telomerase reverse transcriptase)、TERTをコードするポリヌクレオチド、該ポリヌクレオチドを含有するベクターおよび該ベクターを含有する形質転換体のうちの少なくともいずれか1つとを含んでなる試薬キット。

[図1]

64 PPPAAP (TERT) (配列番号9)
14 PPPVAP (MAPKAPK3) (配列番号10)
PPP AP

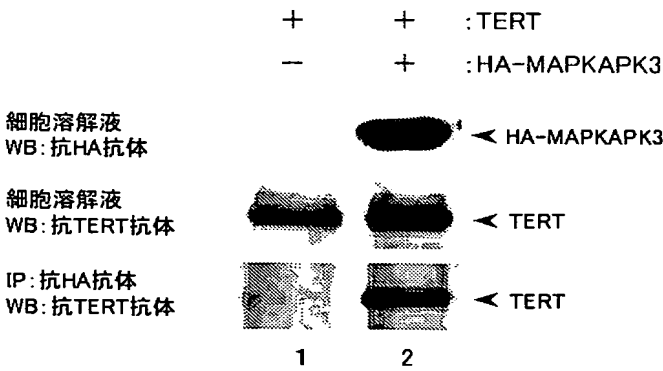
218 APGARR (TERT) (配列番号11)
27 APGGRR (MAPKAPK3) (配列番号12)
APG RR

82 ARVLQ (TERT) (配列番号13)
318 ARVLQ (MAPKAPK3)
ARVLQ

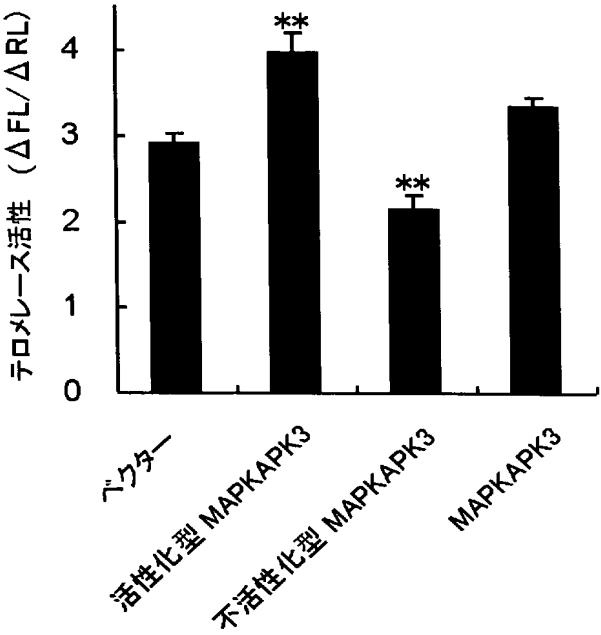
[図2]



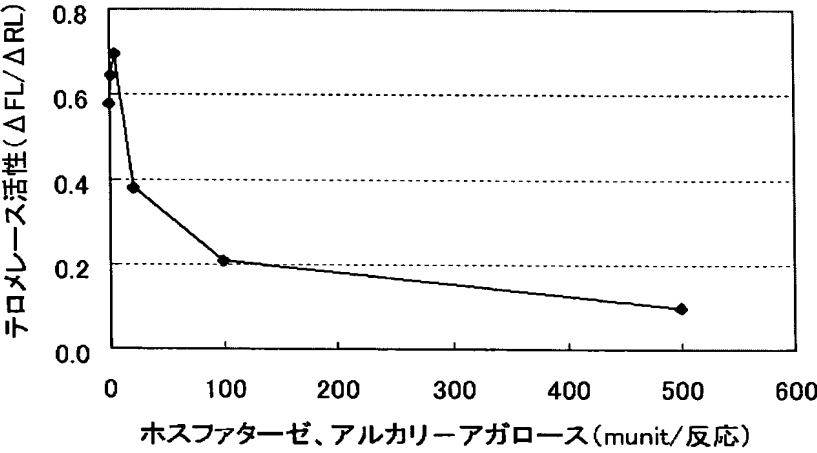
[図3]



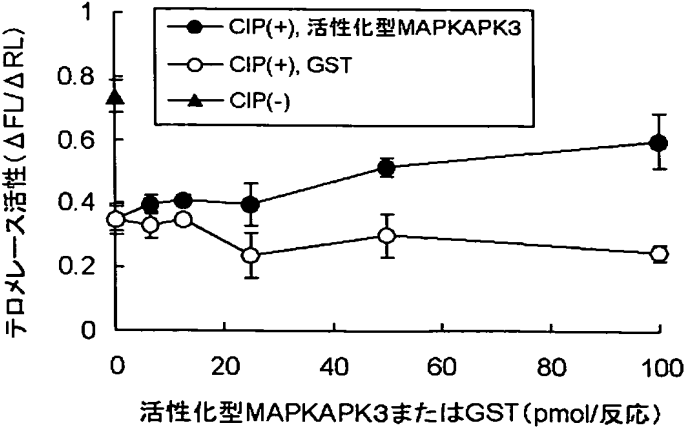
[図4]



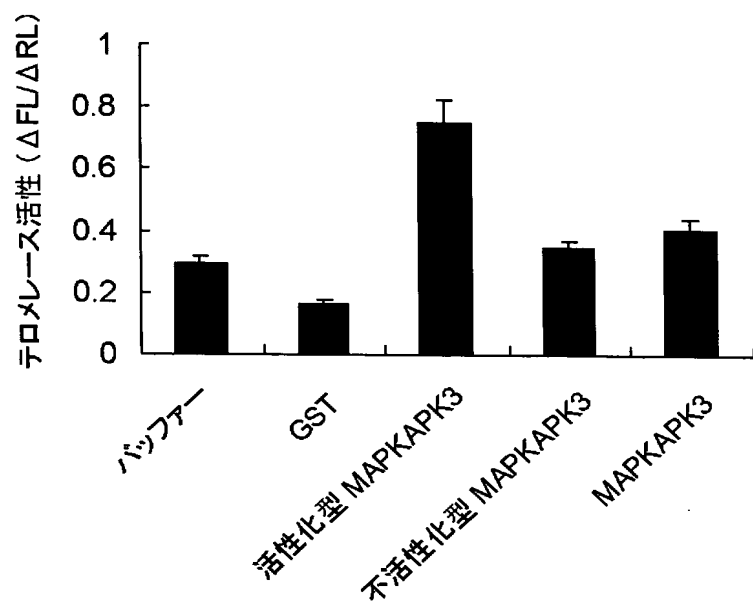
[図5]



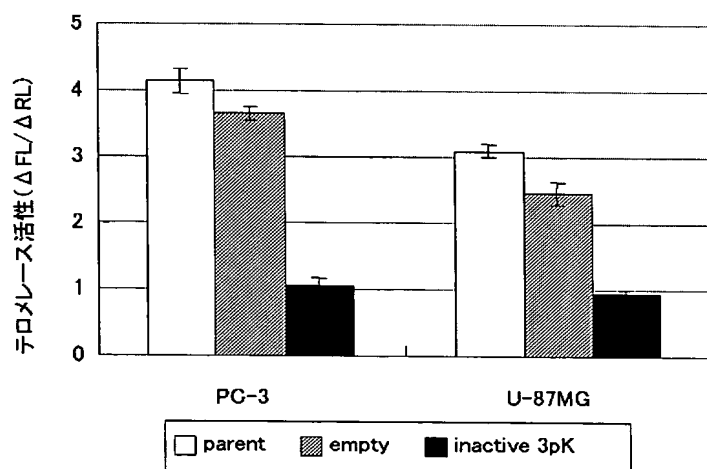
[図6]



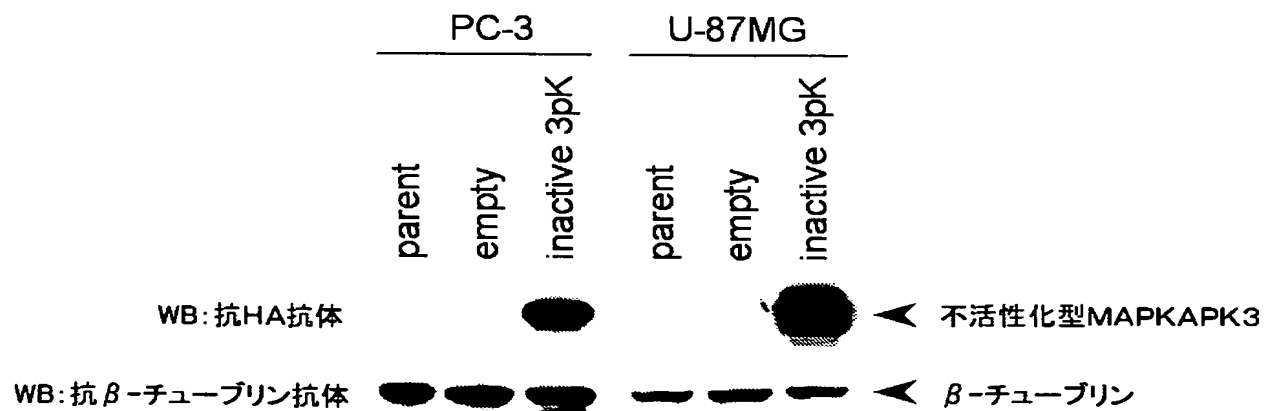
[図7]



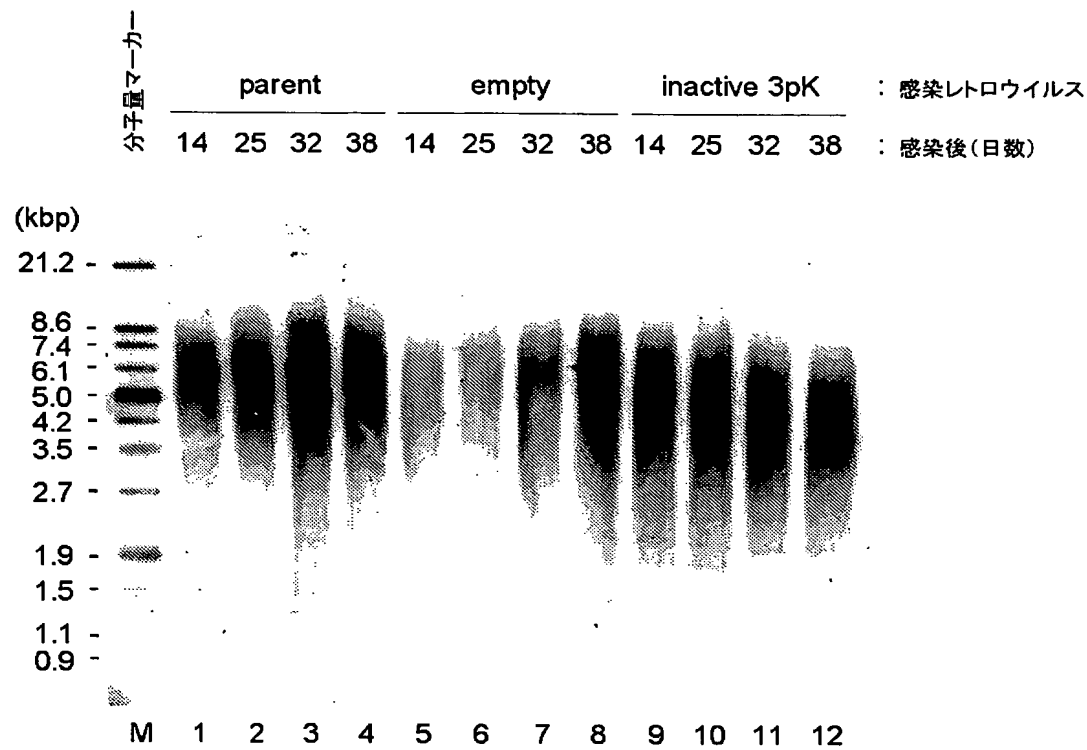
[図8-A]



[図8-B]



[図9]



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008239

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
Int.Cl. ⁷ A61K45/00, 38/55, A61P35/00, 43/00, C12Q1/48, G01N33/15, 33/50// C12N9/99, 15/09		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
Int.Cl. ⁷ A61K45/00, 38/55, A61P35/00, 43/00, C12Q1/48, G01N33/15, 33/50// C12N9/99, 15/09		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Jitsuyo Shinan Koho 1922-1996 Jitsuyo Shinan Toroku Koho 1996-2005 Kokai Jitsuyo Shinan Koho 1971-2005 Toroku Jitsuyo Shinan Koho 1994-2005		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)		
BIOSIS (STN), Caplus (STN), EMBASE (STN), MEDLINE (STN), SwissProt/PIR/ Geneseq		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	KAWAGOE, Jun et al., Raloxifene inhibits estrogen-induced up-regulation of telomerase activity in a human breast cancer cell line., Journal of Biological Chemistry, 2003, 278(44), 43363-72	10-23
A	KANG, S.S. et al., Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit., Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(19), 13085-90	10-23
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 21 July, 2005 (21.07.05)		Date of mailing of the international search report 09 August, 2005 (09.08.05)
Name and mailing address of the ISA/ Japanese Patent Office		Authorized officer
Facsimile No.		Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008239

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2004/005511 A1 (Kansai TLO Kabushiki Kaisha), 15 January, 2004 (15.01.04), & JP 2004-033186 A & EP 1553178 A1	10-23
A	WO 2002/101010 A2 (SIERRA SCIENCES, INC.), 19 December, 2002 (19.12.02), & US 2002/193289 A1	10-23
A	WO 2002/16657 A1 (SIERRA SCIENCES, INC.), 28 February, 2002 (28.02.02), & US 2003/50264 A1 & US 2003/171326 A1	10-23
A	WO 2003/48340 A2 (VERTEX PHARMACEUTICALS INC.), 12 June, 2003 (12.06.03), & EP 1461758 A2	10-23
A	SITHANANDAM G. et al., 3pK, a New Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase Located in the Small Cell Lung Cancer Tumor Suppressor Gene Region, Molecular and Cellular Biology, 1996, 16(3), 868-876.	10-23

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008239

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: 1 - 9
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Claims 1 to 9 pertain to methods for treatment of the human body by therapy and thus relate to a subject matter which this International Searching Authority is not required, under the provisions of the PCT Rule 39.1(iv), to search.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
- ☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2005/008239

<Subject of search>

Claims 12-16 and 18-22 relate to a telomerase activity inhibitor defined by the desired properties "inhibiting of binding between MAPKAPK3 and TERT" and "inhibiting of phosphating of TERT by activated MAPKAPK3", a telomerase activity inhibitor comprising a compound defined by the above properties, a preventive and/or therapeutic agent for diseases attributed to intensification of telomerase activity wherein the above telomerase activity inhibitor is contained, and a telomerase activity inhibitor comprising an inactive variant of MAPKAPK3 defined by the desired property "binding to TERT". Although claims 12-16 and 18-22 cover all the compounds having these properties, it appears that only some of the claimed compounds are supported by the description within the meaning of PCT Article 6 and disclosed therein within the meaning of PCT Article 5.

Moreover, as with respect to the telomerase activity inhibitor defined by the desired properties "inhibiting of binding between MAPKAPK3 and TERT" and "inhibiting of phosphating of TERT by activated MAPKAPK3", a compound defined by the above properties and an inactive variant of MAPKAPK3 defined by the desired property "binding to TERT", the scope of compounds with these properties cannot be specified even if technical common knowledge at the time of filing of this application is taken into account, claims 12-16 and 18-22 also fail to satisfy the requirement of clarity under PCT Article 6.

Therefore, search has been restricted to inhibition of binding between MAPKAPK3 and TERT, to relationship between inhibition of phosphating of TERT by activated MAPKAPK3 and telomerase activity inhibition, and to telomerase activity inhibitors comprising as an active ingredient proteins specified in claim 17 and particularly described in the description.

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/55, A61P35/00, 43/00, C12Q1/48, G01N33/15, 33/50 // C12N9/99, 15/09

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int.Cl.⁷ A61K45/00, 38/55, A61P35/00, 43/00, C12Q1/48, G01N33/15, 33/50 // C12N9/99, 15/09

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報	1922-1996年
日本国公開実用新案公報	1971-2005年
日本国実用新案登録公報	1996-2005年
日本国登録実用新案公報	1994-2005年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

BIOSIS(STN), Cplus(STN), EMBASE(STN), MEDLINE(STN), SwissProt/PIR/Geneseq

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	KAWAGOE Jun et al., Raloxifene inhibits estrogen-induced up-regulation of telomerase activity in a human breast cancer cell line. , Journal of Biological Chemistry, 2003, 278 (44) 43363-72.	10-23
A	KANG S. S. et al., Akt protein kinase enhances human telomerase activity through phosphorylation of telomerase reverse transcriptase subunit. , Journal of Biological Chemistry, 1999, 274 (19) 13085-90.	10-23

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

21. 07. 2005

国際調査報告の発送日

09. 8. 2005

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

4C

9454

上條 のぶよ

電話番号 03-3581-1101 内線 3452

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	WO 2004/005511 A1 (関西ティール・エル・オー株式会社), 2004. 01. 15 & JP 2004-033186 A & EP 1553178 A1	10-23
A	WO 2002/101010 A2 (SIERRA SCIENCES, INC.), 2002. 12. 19 & US 2002/193289 A1	10-23
A	WO 2002/16657 A1 (SIERRA SCIENCES, INC.), 2002. 02. 28 & US 2003/50264 A1 & US 2003/171326 A1	10-23
A	WO 2003/48340 A2 (VERTEX PHARMACEUTICALS INCORPORATED), 2003. 06. 12 & EP 1461758 A2	10-23
A	SITHANANDAM G. et al., 3pK, a New Mitogen-Activated Protein Kinase-Activated Protein Kinase Located in the Small Cell Lung Cancer Tumor Suppressor Gene Region, Molecular and Cellular Biology, 1996, 16 (3) 868-876.	10-23

第Ⅱ欄 請求の範囲の一部の調査ができないときの意見（第1ページの2の続き）

法第8条第3項（PCT17条(2)(a)）の規定により、この国際調査報告は次の理由により請求の範囲の一部について作成しなかった。

1. ☒ 請求の範囲 1-9 は、この国際調査機関が調査をすることを要しない対象に係るものである。
つまり、
請求の範囲 1-9 は、治療による人体の処置方法に関するものであって、PCT規則 39.1(iv)の規定により、国際調査をすることを要しない対象に係るものである。
2. ☐ 請求の範囲 は、有意義な国際調査をすることができる程度まで所定の要件を満たしていない国際出願の部分に係るものである。つまり、
3. ☐ 請求の範囲 は、従属請求の範囲であってPCT規則6.4(a)の第2文及び第3文の規定に従って記載されていない。

第Ⅲ欄 発明の単一性が欠如しているときの意見（第1ページの3の続き）

次に述べるようにこの国際出願に二以上の発明があるところの国際調査機関は認めた。

1. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料をすべて期間内に納付したので、この国際調査報告は、すべての調査可能な請求の範囲について作成した。
2. ☐ 追加調査手数料を要求するまでもなく、すべての調査可能な請求の範囲について調査することができたので、追加調査手数料の納付を求めなかった。
3. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を一部のみしか期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、手数料の納付のあった次の請求の範囲のみについて作成した。
4. ☐ 出願人が必要な追加調査手数料を期間内に納付しなかったため、この国際調査報告は、請求の範囲の最初に記載されている発明に係る次の請求の範囲について作成した。

追加調査手数料の異議の申立てに関する注意

- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがあった。
- ☐ 追加調査手数料の納付と共に出願人から異議申立てがなかった。

＜調査の対象について＞

請求の範囲12-16, 18-22は、「MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する」、「活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する」という所望の性質により定義されたテロメラーゼ活性阻害剤、並びに、上記性質により定義された化合物を含んでなるテロメラーゼ活性阻害剤、並びに、上記テロメラーゼ活性阻害剤を含むテロメラーゼ活性の亢進に起因する疾患の防止および／または治療剤、並びに、「TERTと結合する」という所望の性質により定義されたMAPKAPK3の不活性型変異体を含んでなるテロメラーゼ活性阻害剤に関するものである。そして、請求の範囲12-16, 18-22は、そのような性質を有するあらゆる化合物を包含するものであるが、PCT6条の意味において明細書に裏付けられ、また、PCT5条の意味において開示されているのは、クレームされた化合物のごくわずかな部分にすぎないものと認められる。

また、「MAPKAPK3とTERTの結合を阻害する」、「活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化を阻害する」という所望の性質により定義されたテロメラーゼ活性阻害剤、上記性質により定義された化合物、並びに、「TERTと結合する」という所望の性質により定義されたMAPKAPK3の不活性型変異体は、出願時の技術常識を勘案してもそのような性質を有する化合物の範囲を特定できないから、請求の範囲12-16, 18-22は、PCT6条における明確性の要件も欠いている。

よって、調査は、MAPKAPK3とTERTの結合の阻害、並びに、活性化型MAPKAPK3によるTERTのリン酸化の阻害とテロメラーゼ活性阻害との関係について、及び、明細書に具体的に記載され、請求の範囲17に特定されている蛋白質を有効成分とするテロメラーゼ活性阻害剤について行った。

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.